

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL II

REGULACIÓN OPIOIDE DE LA ACTIVIDAD GTPásica ASOCIADA
A PROTEÍNAS G EN EL SNC DE ROEDORES. PAPEL
REGULADOR DEL DERIVADO ACETILADO DE LA β -ENDORFINA

YOLANDA MARTÍNEZ PEÑA
Junio de 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL II



REGULACION OPIOIDE DE LA ACTIVIDAD GTPásica ASOCIADA
A PROTEINAS G EN EL SNC DE ROEDORES. PAPEL
REGULADOR DEL DERIVADO ACETILADO DE LA β -ENDORFINA

Yolanda Martínez Peña

Tesis Doctoral

Director: Dr. Javier Garzón Niño

Instituto Cajal, C.S.I.C.

Madrid, junio de 1995

D. Javier Garzón Niño, Investigador Científico del Instituto Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que la licenciada Dña. Yolanda Martínez Peña ha realizado bajo su dirección, los trabajos experimentales que han conducido a la elaboración de esta Tesis Doctoral titulada: "Regulación opioide de la actividad GTPásica asociada a proteínas G en el SNC de roedores. Papel regulador del derivado acetilado de la β -endorfina."

Considero que tanto el contenido científico como la presentación de esta memoria reúnen las condiciones necesarias para su defensa.

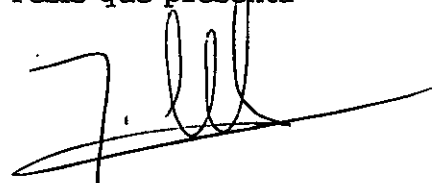
Y para que así conste ante quien proceda, firmo la presente en Madrid a diéciseis de junio de mil novecientos noventa y cinco

El Director de la Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Javier Garzón Niño', written over a horizontal line.

Fdo. Javier Garzón Niño

Tesis que presenta

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Yolanda Martínez Peña', written over a horizontal line.

Fdo. Yolanda Martínez
Peña

El presente trabajo ha sido realizado en la Unidad de Neurofarmacología del Instituto Cajal (C.S.I.C.), bajo la dirección del Dr. Javier Garzón Niño,

Quiero expresar aquí mi agradecimiento al Dr. Javier Garzón Niño, Investigador Científico del C.S.I.C., por su dirección y dedicación en la realización de este trabajo. A la Dra. Pilar Sánchez-Blázquez por su ayuda en los modelos animales utilizados. Así como a la Dra. M^a Luisa Leret Verdú por su amabilidad al actuar como tutora ante el Departamento de Biología Animal II.

Así mismo, deseo agradecer al "Plan de Formación de Personal Investigador de la Comunidad de Madrid" la beca predoctoral que me ha permitido realizar el presente proyecto de Tesis.

A mis padres

A José Luis, Cecilia, Marián, Toni e Isidoro que formaron el grupo en el que se realizó este trabajo. Muchas gracias por vuestro afecto y apoyo constante que me ayudaron a superar las dificultades que surgieron durante la realización de este proyecto de Tesis.

A Bernardo, por su comprensión.

INDICE

INTRODUCCION 6

1. Comunicación intercelular	7
1.1. Desarrollo histórico	8
1.2. Receptores	9
1.3. Proteínas G	13
Subunidad α	18
Complejo $\beta\gamma$	21
1.3.1. Clasificación de las proteínas G	22
Clase G_s	23
Clase G_i	23
Proteína G_i	24
Proteína G_o	25
Proteína G_t	25
Proteína $G_{z/x}$	26
Clase G_q	26
Clase G_{12}	27
1.3.2. Ciclo de activación de las proteínas G	27
1.3.3. Modulación de la actividad GTPásica	29
Mediada por receptores	29
No Mediada por receptores	30
1.4. Sistemas efectores	32
2. Sistema opioide	35
2.1. Péptidos opioides endógenos	35
2.2. Receptores opioides	39
2.3. Acciones fisiológicas de los opioides.	
Participación en los mecanismos adaptativos	
que conducen a la tolerancia-dependencia	45
3. Antecedentes y objetivos del estudio	47

MATERIALES Y METODOS 54

1. Materiales	55
1.1. Animales	55
1.2. Cultivos celulares	55
1.3. Reactivos	56

2. Métodos	57
2.1. Tolerancia y dependencia a morfina	57
2.1.1. Administración crónica de morfina	57
2.1.2. Determinación del grado de tolerancia y dependencia	59
2.2. Obtención y caracterización de los antisueros empleados	60
2.2.1. Técnicas de producción	61
Acoplamiento de los péptidos a la proteína transportadora	62
Acoplamiento con MBS	62
Acoplamiento con carbodiimida	63
Inmunización de los animales	64
Purificación de los antisueros	65
2.2.2. Métodos de caracterización	66
Antisueros frente a las subunidades $G_{12\alpha}$ y $G_{x/\alpha}$ de las	
proteínas G y frente a los receptores opioides μ y δ	66
Electroforesis e inmunotransferencia	66
Antisuero frente a β -endorfina (1-31)	69
1. Titulación	69
2. Sensibilidad	69
3. Selectividad	70
2.3. Determinación del contenido de β -endorfina (1-31) y	
N-acetil- β -endorfina (1-31) en estructuras del SNC e	
hipófisis de la rata y del ratón	71
2.3.1. Extracción de los péptidos. Preparación de las	
muestras	73
2.3.2. Separación de β -endorfina (1-31) y de N-acetil-	
β -endorfina (1-31). Utilización de la cromatografía	
líquida de alta presión	74
HPLC con detección ultravioleta. Generalidades	74
Preparación de las muestras	75
Condiciones cromatográficas	75
2.3.3. Radioinmunoensayo. Metodología general	76
2.4. Determinación de la actividad GTPásica en SNC de ratón	
y en las células híbridas NG 108-15	80
2.4.1. Preparación de los sinaptosomas	80
2.4.2. Preparación de las membranas a partir de células	
híbridas NG 108-15 en cultivo	81
2.4.3. Descripción del método	82
2.4.4. Protocolos experimentales empleados	84
Protocolo inicial	84
Protocolo de preincubación en frío	84
Protocolos de trabajo con antisueros	86
1. Tratamientos "in vitro"	86
2. Tratamientos "in vivo"	87

2.5. Determinación de proteínas	87
2.6. Análisis estadístico	88

RESULTADOS.....89

1. Evolución temporal de la tolerancia y dependencia a la administración crónica de morfina	90
2. Contenido de β -endorfina (1-31) y de N-acetil- β -endorfina (1-31) en estructuras del SNC e hipófisis: efecto de la tolerancia-dependencia.....	93
2.1. Rata	93
2.2. Ratón	94
3. Actividad GTPásica de alta afinidad	99
3.1. Caracterización de la actividad GTPásica del SNC de ratón	99
3.1.1. Evolución en el tiempo de incubación	99
3.1.2. Influencia de la cantidad de proteína	99
3.1.3. Curvas de dilución del [τ - 32 P]GTP	101
3.2. Estudio de la administración crónica de morfina sobre la actividad GTPásica de diferentes áreas del SNC del ratón.....	102
3.2.1. Distribución de la actividad GTPásica de alta afinidad en el SNC del ratón	104
3.2.2. Características cinéticas de la actividad GTPásica de alta afinidad en el SNC de ratón	107
3.3. Efecto estimulador de los opioides sobre la actividad GTPásica.....	107
3.3.1. Modificación de la actividad GTPásica sensible a opioides por antisueros generados frente a las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{16}\alpha$ de las proteínas G	117
3.3.2. Modificación de la actividad GTPásica sensible a opioides por antisueros generados frente a los receptores opioides μ y δ	128
3.4. Efecto del péptido mastoparén sobre la actividad GTPásica.....	138

DISCUSION.....148

1. Cambios en el contenido de β -endorfina (1-31) y N-acetil- β -endorfina (1-31) en el SNC e hipófisis de la rata y el ratón tras la administración crónica de morfina 149
2. Caracterización y distribución de la actividad GTPásica de baja km en el SNC del ratón: efecto de la administración crónica de morfina 155
3. Actividad GTPásica de alta afinidad sensible a opioides 163
4. Efecto de los péptidos mastoparén y N-acetil- β -endorfina (1-31) sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón 175

CONCLUSIONES.....181

REFERENCIAS.....185

ABREVIATURAS MAS UTILIZADAS

AC: Adenilato ciclasa
ACTH: Hormona adrenocorticotropa
Ag: Antígeno
Ag-As: Complejo antígeno-antisuero
AMPc: Adenosina monofosfato cíclico
As: Antisuero
ATP: Adenosina trifosfato
 β -end: β -endorfina (1-31)
BNTX: Hidrocloruro de benzilideno-naltrexona
CTX: Toxina colérica
DADLE: [D-Ala², D-Leu⁵] encefalina
DAGO: [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol⁵] encefalina
DNAC: Acido desoxirribonucleico complementario
DPDPE: [D-Pen^{2,5}] encefalina
GDP: Guanosina difosfato
GTP: Guanosina trifosfato
ICI 174864: N,N-dialil-Tyr-(α -aminoisobutírico)₂-Phe-Leu-OH
i.c.v.: Intracerebroventricular
IgG: Inmunoglobulina G
i.p.: Intraperitoneal
Km: Constante de afinidad
ME: Médula espinal
MSH: Hormona estimulante de melanocitos
NAC: N-Acetil- β -endorfina (1-31)
NTB: Naltribén metanosulfonato
PAG: Sustancia gris periacueductal
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS: Tampón fosfato salino
PDE: Fosfodiesterasa
PLA: Fosfolipasa A
PLC: Fosfolipasa C
POMC: Pro-opiomelanocortina
PTX: Toxina pertúsica
RIA: Radioinmunoensayo
s.c.: Subcutánea
RNAm: Acido ribonucleico mensajero
SNC: Sistema nervioso central

INTRODUCCION

1. Comunicación intercelular

La comunicación en los organismos multicelulares se realiza, en su mayor parte, a través de sustancias químicas extracelulares. Las células delimitan su estructura frente al medio extracelular por una bicapa lipídica que regula el acceso de una serie de sustancias, que pueden ser moléculas tan complejas como las proteínas o tan simples como los iones. Para comunicarse con el medio extracelular, las células han desarrollado mecanismos de transducción de señales que permiten detectar cambios en la concentración de sustancias en su superficie externa, reconocer y transmitir esta información a través de la membrana plasmática y, traducirla en señales intracelulares.

En algunos sistemas de transducción de señales la detección de estímulos extracelulares y la generación de la respuesta intracelular son propiedades de la misma proteína o del mismo complejo proteico. Es el caso de los canales iónicos (por ejemplo, el receptor GABA_A, o el receptor nicotínico de acetilcolina), y el de los receptores con actividad enzimática intrínseca en el dominio intracelular (es el caso de los receptores de insulina y de los factores de crecimiento que presentan actividad tirosina quinasa o del receptor de péptido natriurético que presenta actividad guanilato ciclase). El resto de los sistemas de transducción de señales son más complejos puesto que el receptor y el efector son proteínas distintas que se comunican a través de unas proteínas reguladoras que unen nucleótidos de guanina, las proteínas G.

En la transmisión de señales regulada por proteínas G participan, básicamente, tres componentes:

i) Receptor. Los receptores acoplados a las proteínas G son funcional y estructuralmente homólogos a pesar de la gran variedad de los estímulos que median, desde luz, olor y sabor hasta mensajeros extracelulares como aminas biógenas, proteínas o péptidos. Tienen un tamaño molecular muy parecido (40-120 kDa) y forman siete dominios transmembranares unidos por

tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares. Presentan dos sitios de unión de gran importancia, uno de reconocimiento y unión para el ligando y otro para la interacción con las proteínas G.

ii) Proteína G. Transmite la información desde el receptor hasta el efector intracelular. Es un heterotrímero formado por subunidades α (alfa), β (beta) y γ (gamma), siendo la subunidad α la que une nucleótidos de guanina y presenta actividad GTPásica.

iii) Efector. Genera los cambios intracelulares tras la recepción de la señal. Puede ser un sistema enzimático como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C específica de los fosfatidil-inositoles, la fosfodiesterasa específica de cGMP, la fosfolipasa A₂, transportadores de Mg²⁺ y de glucosa, pero también son efectores los canales de Ca²⁺, K⁺ y Na⁺.

1.1. Desarrollo histórico

El estudio de la transmisión de señales entre células se inició a final de la década de los 50 cuando Rall y col. (1956) estudiaban la estimulación por la hormona adrenalina de la liberación de glucosa en hepatocitos. Los análisis de los fragmentos celulares revelaron que la adrenalina estimulaba la conversión del ATP en un nucleótido, desconocido entonces, el AMPc. Este proceso era catalizado por una enzima de la membrana plasmática, también desconocida, la adenilato ciclasa (AC). La participación de los nucleótidos de guanina en la transmisión de la señal de la adrenalina se demostró años más tarde. Por un lado, se observó que para que la hormona glucagón activara la AC era necesaria la presencia en los ensayos tanto de su receptor como del GTP (Robdell y col., 1971a; Robdell y col., 1971b); y por otro, Cassel y Selinger (1976) descubrieron que cuando se añadía adrenalina a fragmentos de membrana plasmática, no sólo se estimulaba la AC, sino que el GTP se transformaba en GDP y Pi por la acción de una GTPasa.

A finales de los años 70, Ross y Gilman (1977) diseñaron un experimento para restaurar la actividad AC en una línea celular mutante,

denominada cyc^- , que presentaba receptores para la adrenalina pero que aparentemente no expresaba dicha actividad enzimática. Al añadir a estas células un extracto conteniendo actividad AC y exponerlas a la presencia de adrenalina, las células producían AMPc. Sin embargo, sorprendentemente al utilizar un extracto inactivado las células también sintetizaban AMPc. La explicación llegó pronto. Las células cyc^- presentaban actividad AC, pero su silencio se debía a la ausencia de un componente celular esencial para la activación de la enzima. Ross y Gilman demostraron que dicho componente era una proteína que se activaba por el GTP, a la que denominaron proteína G. Asumieron que la adrenalina era capaz de estimular la producción de AMPc al transmitir la información desde su receptor a una proteína G, que tras unir GTP activaba la AC para convertir ATP en AMPc. Esta proteína G fue purificada por Sternweis y col. en 1981 y denominada G_s , ya que estimulaba la AC. Casi simultáneamente se descubrió otro tipo de proteína G que se denominó G_t (o transducina) implicada en la respuesta a la luz de los bastones de la retina (Bitensky y col., 1981; Stryer y col., 1981). Desde entonces, por técnicas de purificación y clonaje se han identificado hasta 21 subtipos distintos de proteínas G.

1.2. Receptores

Los receptores acoplados a proteínas G son proteínas integrales de membrana. Gran cantidad de moléculas, incluyendo hormonas y neurotransmisores, se unen de modo específico a los receptores de la membrana plasmática. La unión de un ligando provoca la interacción del receptor y la proteína G (en su forma heterotrimérica) en la cara intracelular de la membrana, la proteína G se activa y de este modo se inicia la respuesta celular.

Se han descrito tres familias de receptores acoplados a las proteínas G. La familia principal, en la que se incluyen unos 300 miembros, tiene como ligandos a neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas glicoprotéicas, moléculas olfatorias y fotones. Estos receptores se caracterizan por compartir la misma estructura tridimensional y gran similitud de secuencia, al menos en

su porción transmembranar. Los receptores metabotrópicos de glutamato y los de secretina constituyen las otras dos familias de receptores acoplados a proteínas G pero no comparten con la familia principal el patrón de secuencia (Baldwin, 1994).

Tras el clonaje de los receptores de la familia principal se ha podido analizar su estructura aminoacídica formada por 450-600 aminoácidos. Presentan siete dominios transmembranares de carácter hidrofóbico (I, II, III, IV, V, VI y VII), cada uno de ellos con 24-28 aminoácidos, que forman α hélices conectadas entre sí por seis bucles hidrofílicos, tres internos (i_1 , i_2 e i_3) y tres externos (e_1 , e_2 y e_3). El extremo amino terminal, de longitud muy variable y a menudo glicosilado, está expuesto a la cara externa de la membrana plasmática, mientras que el carboxilo terminal, con abundancia de residuos de serina y treonina susceptibles de ser fosforilados, está orientado hacia la cara interna.

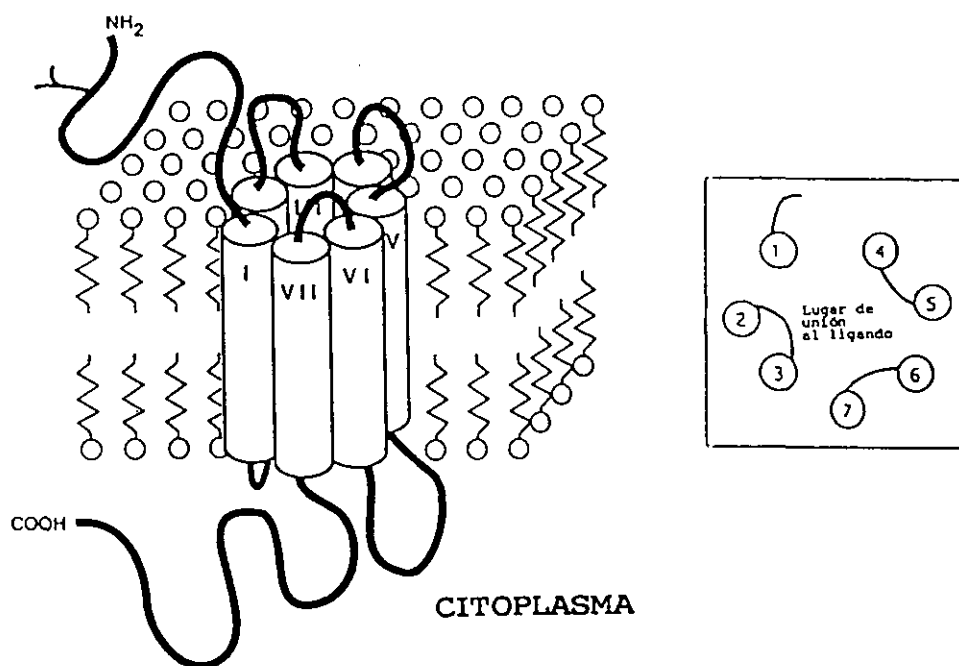


Figura 1. Representación esquemática de un receptor acoplado a proteínas G en la que se observan los siete dominios transmembranarios que se agrupan formando una zona que es reconocida por los ligandos. En el recuadro se ofrece una visión del plano exterior de la membrana plasmática en el que se aprecia cómo las α hélices participan en la creación del sitio de unión para el ligando.

De las aproximaciones experimentales que se utilizan para estudiar la estructura y función de los receptores, la mutagénesis dirigida y la construcción de receptores quiméricos son las que proporcionan una mejor información sobre qué regiones del receptor son esenciales para la interacción con el ligando y con las proteínas transductoras.

Los dominios transmembranarios además de anclar el receptor a la membrana, generan el sitio específico de unión para los agonistas y antagonistas, al menos en el caso de los receptores para hormonas, neurotransmisores pequeños y fotones. Sin embargo, en los receptores para hormonas de alto peso molecular como son las glicosiladas: la hormona estimulante del tiroides (TSH), la hormona luteínica (LH)/la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona estimulante de los folículos (FSH), el sitio de unión específico para los ligandos parece estar localizado en los dominios extracelulares del receptor (Bockaert, 1991). En este trabajo se van a describir únicamente los receptores mencionados en primer lugar. En los dominios transmembranarios del receptor es donde se da la mayor conservación en las secuencias. Entre los receptores de una misma subfamilia (para un mismo ligando) se da mayor coincidencia, disminuyendo la homología al comparar receptores de distintas subfamilias. Presentan gran abundancia de residuos de prolina y glicina que, i) podrían contribuir a la formación de un "bosillo" al que solamente se uniría de modo específico un determinado ligando y, ii) podrían participar en la transmisión a la zona intracelular de la molécula los cambios conformacionales que el receptor sufre tras la unión del ligando.

El lugar del reconocimiento para el ligando también presenta características comunes en los diferentes receptores. Los residuos conservados (con carga neta negativa) de los segmentos transmembranarios podrían actuar como estabilizadores de carga para los ligandos (cargados positivamente). De especial importancia en la unión de agonistas parece ser un residuo de ácido aspártico localizado en el segmento transmembranario II de los receptores. Su sustitución por un residuo de asparagina en el receptor opioide δ supone la pérdida de la afinidad para los agonistas δ selectivos pero

no afecta a la unión de antagonistas ni a la de agonistas opioides no selectivos lo que sugiere que los agonistas específicos y los antagonistas se unen de modo distinto a este receptor (Kong y col., 1993).

La interacción con las proteínas G se localiza en el tercer bucle intracelular (i_3), entre las hélices transmembranares V y VI, y en el extremo carboxilo terminal, después del segmento VII (Dixon y col., 1987; Lefkowitz y col., 1989; Lefkowitz y col., 1993; Sullivan y col., 1987). A este reconocimiento también contribuirían los residuos cargados de los segmentos transmembranares. Del estudio de mutantes del receptor muscarínico m_3 de acetilcolina (Kunkel y Peralta, 1993) y de los trabajos realizados con el receptor dopaminérgico D_2 (Malek y col., 1993) se ha podido determinar la importancia para la transducción de señales de dos agrupaciones de residuos de carácter básico localizadas cerca de los segmentos transmembranares V y VI. El bucle i_2 también parece ser un punto de contacto entre receptor y proteína G (Sullivan y col., 1987; Taylor, 1990). Trabajos recientes con receptores de acetilcolina han puesto de manifiesto la importancia de un dominio hidrofóbico del bucle i_2 en el acoplamiento de los receptores a las proteínas transductoras G que median la inhibición de la AC y la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) (McClue y col., 1994; Moro y col., 1993; Zhu y col., 1994). Dado que la sustancia P, el mastoparén, y otros péptidos que presentan en su secuencia agrupaciones de residuos de carácter básico estimulan la actividad GTPásica en presencia de fosfolípidos, se piensa que son capaces de activar directamente las proteínas G mimetizando la zona del receptor con acumulación de cargas positivas (Higashijima y col., 1988; 1990; Mousli y col., 1990). A pesar de estas similitudes, se observan pocas homologías de secuencia en las regiones del receptor implicadas en el acoplamiento con proteínas G incluso en aquellos que interaccionan con las mismas proteínas G (Strosberg, 1991).

1.3. Proteínas G

Las proteínas G coordinan la relación receptor-efector ya que reciben la información desde los receptores y la transducen para regular a los efectores proteicos (enzimas o canales iónicos), que posteriormente movilizan a los segundos mensajeros intracelulares. Se encuentran en todas las células eucarióticas en las que controlan funciones metabólicas, hormonales y de desarrollo. Forman parte de una gran familia de GTPasas en la que se incluyen:

i) proteínas G de bajo peso molecular (en torno a 20–25 kDa). Se incluyen las subfamilias Ras, Rho, Rab, Rac y Arf, que participan en la proliferación y diferenciación celular, en el transporte vesicular, en la organización del citoesqueleto y en la regulación de funciones nucleares (Bourne y col., 1990; Feig, 1994; Lledo y col., 1994). Los factores bacterianos relacionados con la síntesis proteica (como el factor de elongación bacteriano TU) también se han clasificado dentro de este grupo.

ii) proteínas G heterotriméricas formadas por tres subunidades distintas: α , β y γ , de pesos moleculares 40–46, 37 y 7–9 kDa, respectivamente. En estas proteínas vamos a centrar la exposición del presente trabajo. Son las encargadas de la transducción de señales extracelulares en respuestas intracelulares aunque, al igual que las proteínas G de bajo peso molecular, también participan en la formación, transporte y exocitosis de las vesículas de secreción (Aroni y DiFiglia, 1992).

La subunidad α de las proteínas G heterotriméricas presenta actividad enzimática intrínseca. Cuando se encuentra unida al GDP, la subunidad α es inactiva. Un receptor activado por un ligando cataliza el intercambio de GDP por GTP en la proteína G, que entonces interacciona con una proteína efectora para producir una señal intracelular. El estado activo de la proteína G finaliza con la actividad GTPásica intrínseca. Como en el caso de las proteínas G heterotriméricas, las proteínas G de bajo peso molecular también

interaccionan con proteínas "receptoras" y "efectoras" específicas. Estas interacciones se regulan por el estado "activo" (GTP unido) o "inactivo" (GDP unido) de las proteínas G. En la **Figura 2** se comparan los componentes que participan en el ciclo de activación de las proteínas G de bajo peso molecular y de las proteínas G heterotriméricas. Como se observa en esta figura se han descrito gran número de proteínas que interaccionan con las proteínas G de bajo peso molecular, sin embargo, su designación como receptoras o efectoras todavía no está clara. Entre estas proteínas se encuentran i) las GAPs (proteínas activadoras de la actividad GTPásica), que estimulan la actividad GTPásica de baja Km y que son específicas para cada subfamilia de proteínas G de bajo peso molecular, y ii) las GEPs (proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina) formadas por inhibidores y estimuladores de la disociación de GDP, que interaccionan con las proteínas G de bajo peso molecular cuando están unidas al GDP, regulan la liberación de GDP y por tanto la tasa de conversión entre los estados inactivo y activo. En contraposición con las GAPs, las GEPs no son totalmente específicas y parecen ser capaces de regular proteínas G de bajo peso molecular pertenecientes a diferentes subfamilias (Yamane y Fung, 1993). Feig (1994) ha propuesto como GEPs para la subfamilia Ras a receptores con actividad tirosina quinasa como es el caso del receptor para el factor de crecimiento epidérmico.

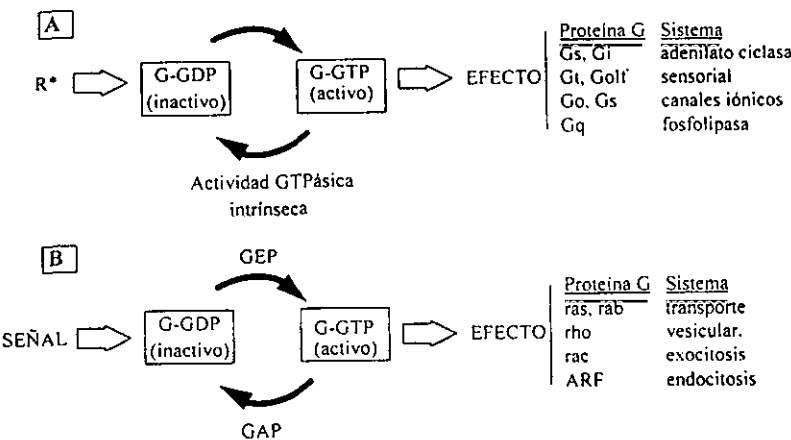


Figura 2. Mecanismos de transducción de señales mediados por proteínas G. Panel A: Activación de las proteínas G heterotriméricas. Un receptor activo cataliza el intercambio del GDP por GTP en la subunidad α . Panel B: Componentes conocidos de la transducción mediada por las proteínas G de bajo peso molecular. Una señal conduce a la proteína G a su estado activo, proceso facilitado por GEPs. En ambos casos la actividad GTPásica devuelve a la proteína G a su estado inactivo.

Tabla 2. Propiedades de las subunidades G_β y G_γ de mamíferos.

Subunidad	Mm (KDa $\times 10^3$)	% Ident. de aas (a)	Distribución en los tejidos	Efector/ función
G_β				
β_1	37.3	100	Ubícu	Necesaria para la interacción de la G_α con el receptor.
β_2	37.3	90	Ubícu	
β_3	37.2	83	Ubícu	Inhibición de la activación por G_α .
β_4	37.2	89	Ubícu	Modulación de la activación de ciertas AC por las G_α o calmodulina.
				Soporte para la desensibilización y fosforilación del receptor inducidas por agonista.
G_γ				
γ_1	8.4	100	Retina, otros(?)	\uparrow PLC
γ_2	7.9	38	Cerebro, adrenales, otros	\uparrow Canales de K^+ (?)
γ_3	8.5	36	Cerebro, testículos	
γ_4	(?parcial)	(34)	[Riñón, retina(?)]	\uparrow PLA ₂ (?)
γ_5	7.3	25	Hígado, otros(?)	
γ_6	7.5	35	Cerebro, otros(?)	
(a) Porcentaje de identidad entre aminoácidos. Comparación con el primer miembro de cada clase.				

Todas las subunidades α contienen segmentos de secuencia homólogos a las secuencias de las proteínas G de bajo peso molecular, por ello se piensa que estas regiones tan conservadas en las subunidades α son las directamente relacionadas con la hidrólisis del GTP. Estas regiones se han denominado A, C, G, e E (Figura 3).

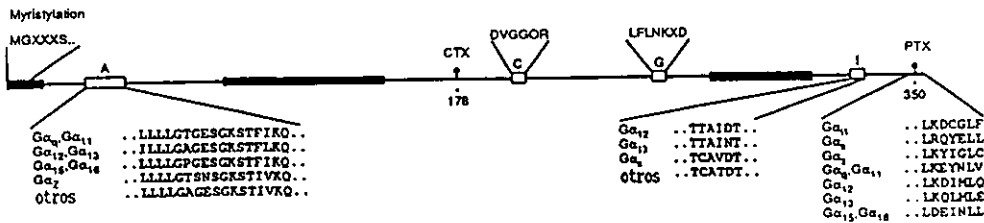


Figura 3. Distribución de la especificidad de secuencias entre las distintas subunidades G_{α} . Las cajas vacías representan los dominios altamente conservados. Las cajas oscuras son las regiones que presentan mayor diversidad en las secuencias de aminoácidos entre las diferentes subunidades.

La subunidad β y la subunidad τ forman el complejo estable $\beta\tau$, que solamente es dissociable en condiciones desnaturalizantes (Neer y Clapham, 1988). La afinidad del complejo $\beta\tau$ por la subunidad α viene determinada por los subtipos de β y de τ que lo forman (Kleuss y col., 1993). Recientemente se ha implicado al complejo $\beta\tau$ en la transmisión de señales intracelulares, como la activación de la fosfolipasa A_2 (PLA_2), la PLC o de la AC. Como los complejos $\beta\tau$ son compartidos por diferentes subunidades α para formar el heterotrímero, las características de la subunidad α se emplean en los trímeros para definir a la proteína G completa. En zonas muy concretas con una gran especialización en la transmisión de información como son los sinaptosomas, se ha observado la existencia de proteínas G no sólo como heterotrímeros sino también como multímeros de tamaño variable (Coulter y Rodbell, 1992; Jahangeer y Rodbell, 1993; Nakamura y Rodbell, 1990). Recientemente se ha propuesto un modelo, apoyado en gran medida en la observaciones anteriores, que limita la movilidad de las proteínas G en la membrana. Según este modelo los receptores, las proteínas G y posiblemente también los efectores se encuentran organizados en grandes complejos moleculares que limitan su movilidad en la membrana y potencian la especificidad de las interacciones que se dan entre ellas (Neubig, 1994).

Por técnicas de clonaje y secuenciación se han identificado en células de mamíferos 21 subunidades α diferentes, 4 subunidades β y 6 subunidades γ . Las primeras proteínas G se aislaron por técnicas convencionales de purificación y se les asignó un subíndice según la función que desempeñaran. A la proteína G que ejercía un efecto estimulatorio sobre la AC se la denominó G_s (de "stimulation"), mientras que a la que ejercía un efecto inhibitorio sobre la AC se la denominó G_i (de "inhibition") (Bokoch y col., 1984; Hildebrandt y col., 1983). La proteína G_s se encontró por primera vez en el tejido atrial en el corazón y está relacionada con la regulación de los canales de potasio. Sin embargo, al aumentar el número de proteínas G identificadas por técnicas de clonaje, los nombres que les fueron asignados ya no aluden a su función. La $G_{s/1}$, como la G_i , también está relacionada con la inhibición de la AC pero no es susceptible de ser ribosilada por la PTX (Casey col., 1990). La G_q está implicada en la regulación de la PLC (isoforma β). La vista y el olfato están mediadas por las proteínas G_t (de "transducin") y $G_{o/1}$ (de "olfactory"), respectivamente. Recientemente ha sido descrita una nueva proteína G, la G_g (de "gustducin"), cuya expresión está limitada a las papilas gustativas. Presenta un 80% de homología de secuencia con las G_t , especialmente en las regiones de las subunidades α que interaccionan con los receptores y los efectores, y se la relaciona con una fosfodiesterasa. Por último, la G_o (de "other") se localiza fundamentalmente en tejidos excitables como el corazón, la médula espinal o el cerebro. Esta distribución sugiere que la G_o está asociada a la función de canales iónicos que controlan la excitabilidad de las células. En la **Tabla 1** se resumen las características de las proteínas G mejor conocidas.

Subunidad α

La subunidad α presenta actividad GTPásica intrínseca, además de un único sitio de alta afinidad para la unión de nucleótidos de guanina, sus características determinan la subfamilia dentro de la cual se ubica el trimero y determina la especificidad de la proteína G por un receptor y un efector concretos.

En algunos casos las subunidades α presentan residuos que pueden ser modificados covalentemente por toxinas bacterianas. La toxina del cólera (CTX) cataliza la transferencia de una unidad de ADP-ribosa desde el NAD (nicotinamida adenina nucleótido) a un residuo de arginina de las subunidades α de determinadas proteínas G. En concreto, a la Arg¹⁷⁸ de la G_s y a la Arg¹⁷⁴ de la G_{i1}. La toxina pertúsica (PTX) cataliza la transferencia de una unidad de ADP-ribosa desde el NAD a aquellas subunidades α que poseen un residuo de cisteína en la cuarta posición contando a partir del extremo carboxilo terminal. Las proteínas G que pueden sufrir esta modificación son las G_{i1}, G_o y la G_{i1}. La modificación de las subunidades α por la CTX conduce a una activación continua de estas proteínas (por inhibición de la actividad GTPásica), mientras que la modificación por la PTX impide la activación de la proteína G por el receptor.

Aunque ninguna de las subunidades α contiene regiones que se puedan asociar a la bicapa lipídica, el heterotrímero está fuertemente unido a la membrana plasmática (Hepler y Gilman, 1992). A esto parecen contribuir ciertas modificaciones lipídicas que pueden sufrir las proteínas G. En concreto, los ácidos grasos miristoico y palmítico pueden encontrarse unidos covalentemente a las subunidades α de las proteínas G. Las subunidades α de las proteínas G_{i1}, G_{i2}, G_{i3}, G_o, G_{x/x} y G_t, es decir aquellas que presentan en el extremo amino terminal un residuo de glicina, pueden estar miristoiladas. La incorporación del ácido miristoico es un proceso co-translacional esencial para que las subunidades α establezcan interacciones de alta afinidad con el complejo $\beta\gamma$ y, por tanto, para anclar el heterotrímero a la membrana (Yamane y Fung, 1993). Las subunidades α también pueden incorporar post-translacionalmente un residuo de ácido palmítico mediante enlaces muy lábiles de naturaleza tioéster que se establecen con los residuos de cisteína del extremo amino terminal. La palmitoilación contribuye a la interacción de la subunidad α con su efector (Casey, 1994).

El extremo amino terminal de la subunidad α participa en la unión con el complejo $\beta\gamma$. Dado que la ADP-ribosilación de las subunidades α bloquea la interacción de la proteína G con el receptor y que la presencia de

antisueros específicos contra el extremo carboxilo terminal previene la activación de las proteínas G mediada por el receptor, se piensa que el extremo carboxilo terminal es el implicado en la relación con el receptor. Con respecto a la zona implicada en la interacción con los efectores se especula que la secuencia de la región carboxilo terminal determina la especificidad del efector (Simon y col., 1991). En base al análisis cristalográfico del factor de elongación TU y a las secuencias aminoacídicas de las subunidades α clonadas se ha propuesto un modelo tridimensional para las subunidades α (Figura 4).

Hasta el momento se han clonado y secuenciado 21 subunidades α en vertebrados. Todos los subtipos de subunidades α están altamente conservados con variaciones entre especies menores a un 3%. Esta conservación podría significar que cada subtipo tiene un papel específico en la transducción de señales. Las diferencias aminoacídicas entre un subtipo y otro no están distribuidas al azar en la secuencia sino que están agrupadas en regiones bien definidas. Una zona en la que se observa gran variabilidad es la comprendida entre los residuos 85 y 125. Aunque esta zona es muy diferente de una subunidad α a otra, está muy conservada en el mismo subtipo de α en diferentes especies.

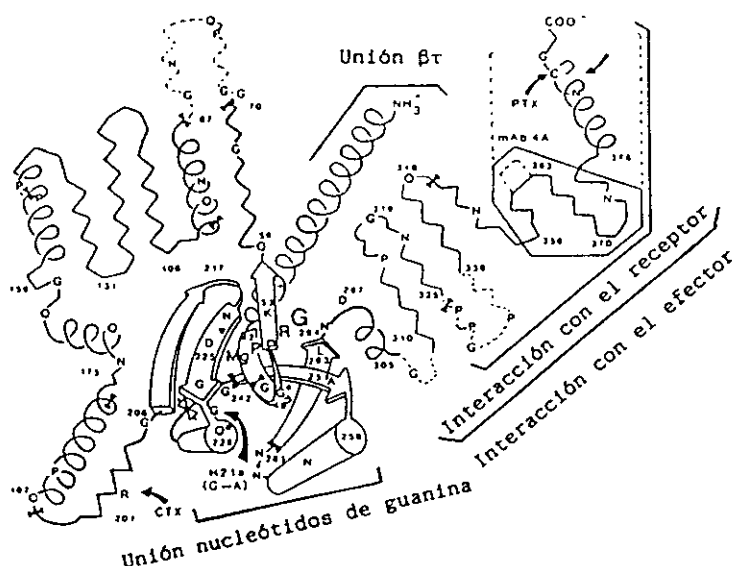


Figura 4. Modelo tridimensional propuesto para las subunidades α . Se señalan las regiones implicadas en unión de nucleótidos de guanina, así como las regiones implicadas en la interacción con los receptores (extremo carboxilo terminal) y con el complejo $\beta\gamma$ (extremo amino terminal).

Complejo $\beta\tau$

En mamíferos se han encontrado cuatro isotipos distintos de subunidades β : β_1 , β_2 , β_3 y β_4 , cada una de ellas formada por 340 aminoácidos. Presentan un 80% de identidad en su secuencia, sin embargo, los tipos β_1 y β_2 tienen la misma secuencia aminoacídica en todas las especies en las que se han clonado (Fong y col., 1987; Levine y col., 1990; Von Weizsacker y col., 1992). Los subtipos β_1 , β_2 y β_3 se encuentran ampliamente distribuidas, mientras que el β_4 es únicamente abundante en tejido nervioso y pulmón (Tabla 2).

En la secuencia aminoacídica de todas las subunidades β clonadas aparece un patrón repetitivo de secuencia. Se observan ocho segmentos, cada uno de los cuales presenta una secuencia de 40 aminoácidos en la que destacan determinados pares especialmente el formado por triptófano y ácido aspártico. La única excepción a esta topología repetitiva es el extremo amino terminal, que adopta una estructura de α hélice y que parece estar directamente implicado en la interacción entre las subunidades β y τ .

Por técnicas electroforéticas, inmunológicas, de clonaje y secuenciación de proteínas se han identificado 7 subunidades τ distintas, cada una de ellas con una cadena de 75 aminoácidos de longitud y poca homología de secuencia (Robishaw y col., 1989; Tamir y col., 1991). El tipo τ_2 se expresa prácticamente en todos los tejidos estudiados, el τ_3 es especialmente abundante en cerebro y testículos, mientras que el tipo τ_1 se expresa únicamente en los fotorreceptores (Tabla 2).

Las subunidades τ de todas las proteínas G pueden encontrarse modificadas post-translacionalmente. La modificación consiste en la eliminación de los tres aminoácidos del extremo carboxilo terminal adyacentes a un residuo de cisteína, y su carboximetilación e isoprenilación posterior (Mumby y col., 1990). El tipo τ_1 en la cisteína carboxilo terminal incorpora un grupo farnesil. Las subunidades τ de cerebro se encuentran poliisopreniladas y además incorporan en el extremo carboxilo terminal una

unidad de trans-geranilgeranil (Yamane y col., 1990). Estas modificaciones podrían participar en el anclaje de la subunidad τ a la membrana y son esenciales para que los complejos $\beta\tau$ sean activos. A pesar de que las subunidades α de las proteínas G_i , G_o y G_t presentan un residuo de cisteína en esa posición no sufren esta modificación (Casey, 1994; Yamane y col., 1993).

Las subunidades β y τ aparecen en estructuras nativas formando parte de la proteína G heterotrimérica, en asociación con una subunidad α , o como una mezcla de dímeros $\beta\tau$ no dissociables (Neer y Clapham, 1988). Recientemente se han descrito efectos directos de los complejos $\beta\tau$ sobre efectores celulares purificados. Los complejos $\beta\tau$ estimulan la PLA_2 en la retina, activan los canales de K^+ regulados por acetilcolina del corazón, activan determinadas isoformas de la PLC (β_2 y β_3) y tienen un efecto dual sobre la AC estimulando las isoformas AC-II y AC-IV e inhibiendo la AC-I (Camps y col., 1992; Jelsema y Axelrod, 1987; Katz y col., 1992; Logothetis y col., 1987; Tang y Gilman, 1991). Todavía no se ha podido determinar si la disociación de la proteína G heterotrimérica es esencial para la activación del complejo $\beta\tau$ (Clapham y Neer, 1993).

Se podría concluir que los complejos $\beta\tau$ tienen diversas funciones en la transducción de señales a través de la membrana: i) estabilizar la interacción de las subunidades α con los receptores, ii) modular los efectos de las subunidades α activadas, y iii) regular la actividad de los efectores celulares.

1.3.1. Clasificación de las proteínas G

La secuencia de aminoácidos de las diferentes subunidades α ha puesto de manifiesto que el 20% de los aminoácidos están conservados. Sin embargo, las diferencias en la secuencia son suficientes como para permitir la clasificación de los diferentes subtipos (**Tabla 1**). Se han clasificado en cuatro familias o clases. La clase G_{12} , que incluye los dos tipos de $G_{12\alpha}$ y la $G_{12t\alpha}$; la clase G_i , de la que forman parte los tres tipos de $G_{i\alpha}$, los dos de la

$G_o\alpha$, las dos transducinas, la G_s y la $G_{x/x}\alpha$; la clase G_q , formada por la $G_q\alpha$, la $G_{11}\alpha$, la $G_{14}\alpha$, la $G_{15}\alpha$ y la $G_{16}\alpha$; y la clase G_{12} integrada por las $G_{12}\alpha$ y $G_{13}\alpha$.

Clase G_i

En esta familia se incluyen tanto las $G_i\alpha$ como la $G_{o1}\alpha$. Activan la AC y estimulan los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Dolphin, 1991; Yatani y col., 1988a). Los receptores implicados en estos efectos incluyen los β_1 -, β_2 - y β_3 -adrenérgicos, D_1 -dopaminérgicos, $1A$ -serotoninérgicos y receptores para glicoproteínas (Strosberg, 1991).

Las técnicas de clonaje molecular han revelado la existencia de primero dos y luego cuatro formas de DNAC para la $G_i\alpha$, que difieren en la presencia o ausencia de un fragmento de 42 o 45 nucleótidos en la posición 242. Estos DNAC proceden de un mismo gen que por procesamiento alternativo origina los distintos RNAm (Bray y col., 1986). Las dos formas cortas tienen 380 y 381 aminoácidos y las dos largas 394 y 395, con un fragmento de 15 aminoácidos insertado en el residuo Arg⁷¹. Los pesos moleculares esperados para los cuatro polipéptidos estarían en el rango 44.2-45.7 kDa, sin embargo, en electroforesis de SDS migran en dos bandas con pesos moleculares aparentes de 45 y 52 kDa. La Arg²⁰² es el sitio de la ADP-ribosilación por la CTX.

La subunidad α_{o1} , se expresa únicamente en las células neuroepiteliales del epitelio olfatorio donde estimula la AC. Tiene 381 aminoácidos y estructuralmente se parece mucho a las subunidades α_i con las que comparte un 90% de identidad de secuencia. Al igual que las subunidades α_i , es susceptible de ser ribosilada por la CTX (Jones y Reed, 1989).

Clase G_t

Es la familia más amplia e incluye las proteínas $G_t\alpha$, $G_o\alpha$, $G_{t1}\alpha$ y $G_{x/x}\alpha$, que conservan su estructura génica aunque provienen de genes distintos. Al comparar los genes que codifican para $G_t\alpha$, $G_o\alpha$ y $G_{t1}\alpha$ se observa que todos

ellos conservan las posiciones de sus intrones y exones.

Proteína G_i

En un principio se asoció exclusivamente a los miembros de esta clase con la inhibición de la AC (Bokoch y col., 1984; Katada y col., 1984) en contraposición con la familia de las G_s (Hildebrandt y col., 1983), sin embargo, en la actualidad también se las relaciona con otros efectores como son los canales de K^+ y de Ca^{2+} (Yatani y col., 1988b) a través de los receptores α_2 -adrenérgicos, D_2 -dopaminérgicos, m_2 , m_3 y m_4 -muscarínicos, A_2 -purinérgicos, de somatostatina, opioides (Freissmuth y col., 1991; Kurose y col., 1986; Milligan y col., 1985; Murray-Whelan y Schlegel, 1992; Strosberg, 1991; Ueda y col., 1988).

Se han clonado tres DNAs para tres subtipos diferentes de α_i , a partir de diferentes tejidos, presentan alta homología de secuencia y cada uno de ellos procede de un gen independiente. Codifican para subunidades α de 40-41 kDa de peso molecular, presentan distintas cinéticas de unión y liberación de nucleótidos de guanina (Carty y col., 1990) y son sustratos de la PTX. Estas subunidades se han denominado α_{i1} , α_{i2} y α_{i3} en función del orden en que han sido clonadas (Suki y col., 1987). Tienen 354, 355 y 354 aminoácidos, respectivamente y presentan entre un 88 y un 94% de identidad de secuencia. Los tres subtipos están ampliamente distribuidos en todos los tejidos, incluido SNC y fibras nerviosas periféricas, además de en líneas celulares (Berti-Mattera y col., 1992; Orford y col., 1991; Young y col., 1993). Está establecido que las tres $G_i\alpha$ inhiben la AC y promueven la apertura de los canales de K^+ , aunque la inhibición de la AC sólo ha podido ser demostrada "in vivo" para la $G_{i2}\alpha$ (Moxham y col., 1993). El subtipo $G_{i3}\alpha$ parece ser el más directamente implicado en la regulación de los canales de K^+ (Codina y col., 1988) y en ciertos tipos de células se le ha relacionado con procesos de transporte vesicular y exocitosis (Aridor y col., 1993).

Proteína G_o

Esta proteína fue purificada por primera vez a partir de cerebro bovino por Sternweiss y Robishaw en 1984. En el cerebro de mamíferos se han descrito tres variantes del subtipo G_oα: G_{o1}α, G_{o2}α y, el recientemente observado, G_{o3}α. Los subtipos G_{o1}α y G_{o2}α se generan por procesamiento diferencial del mismo gen y tienen un comportamiento electroforético semejante. De hecho, la mayoría de los tejidos contienen los dos polipéptidos (Strathmann y col., 1990). Las dos variedades únicamente difieren en el extremo carboxilo terminal de su secuencia aminoacídica y presentan el residuo Cys susceptible de ser ADP-ribosilado por la PTX.

Regula canales de Ca²⁺, de K⁺ y la activación de la PLC, a través de receptores de GABA_B, 2-serotoninérgicos, α₁-adrenérgicos, m₁, m₃ y m₅-muscarínicos y opioides (Hescheler y col., 1987; Moriarty y col., 1990; Sweeney y Dolphin, 1992; Ueda y col., 1988; VanDongen y col., 1988; Yatani y col., 1988b). El subtipo G_{o3}α tiene un peso molecular aparente mayor, inmunológicamente se parece más al subtipo G_{o2}α y, podría controlar efectores distintos a los manejados por G_{o1}α y G_{o2}α (Nürnberg y col., 1994). Se localiza fundamentalmente en el tejido nervioso, tanto a nivel central como periférico, y en líneas celulares (Asano y col., 1990; Canlon y col., 1991; Carter y Medzihradsky, 1993).

Proteína G_t

Es la implicada en el mecanismo de la fotorrecepción en la retina y media entre la rodopsina y la fosfodiesterasa (PDE) dependiente de cGMP. Se han clonado dos tipos de α_t. Uno se expresa en los conos (α_{t2} o α_t-c, de "cone") y otro en los bastones (α_{t1} o α_t-r, de "rod") y parecen estimular diferentes PDE dependientes de c-GMP. Tienen 350 y 354 aminoácidos y comparten un 80% de identidad aminoacídica (Birmbauer y col., 1990). Aunque las dos formas presentan en su secuencia los residuos Arg y Cys susceptibles de ser modificados por CTX y PTX, respectivamente, únicamente la G_{t1}α es ribosilada por ambas toxinas.

Proteína $G_{\alpha s}$

La secuencia aminoacídica de la $G_{\alpha s}$ es muy parecida a la de las $G_{\alpha i}$ y $G_{\alpha o}$, pudiendo sufrir las mismas modificaciones lipídicas. En concreto, tiene 355 aminoácidos y presenta entre un 41 y un 67% de identidad de secuencia con las otras subunidades α (Fong y col., 1988; Matsuoka y col., 1988). Sin embargo, carece del residuo Cys del extremo carboxilo terminal susceptible de ser ribosilado por la PTX (Casey y col., 1990). También difiere del resto de subunidades α en que tiene sustituciones en la secuencia en las regiones especialmente conservadas en el resto de las proteínas G (Matsuoka y col., 1988). Tiene una expresión más limitada, siendo especialmente abundante en el SNC, plaquetas, bazo y espermatozoides (Casey y col., 1990; Hinton y col., 1990). Esta distribución tan restringida podría sugerir una función muy especializada de este tipo de proteínas.

Estudios realizados con subunidades $\alpha_{s/1}$ purificadas han puesto de manifiesto su baja velocidad de intercambio de nucleótidos de guanina y su extremada dependencia de iones de Mg^{2+} en comparación con otras subunidades α . Estas propiedades cinéticas podrían ser resultado de la secuencia aminoacídica diferencial que esta proteína presenta en el sitio de unión para los nucleótidos de guanina (Casey y col., 1990). En experimentos de reconstitución la activación de los receptores α_2 -adrenérgico, D_2 -dopaminérgico y A_1 -purinérgico en la línea celular de riñón 293 promueve la inhibición de la AC, lo que indicaría de nuevo una estrecha relación entre las proteínas G_i y la $G_{s/1}$ (Wong y col., 1992).

Clase G_q

Todas las proteínas que se agrupan en esta clase carecen del lugar de modificación para la PTX y activan a diferentes miembros de la PLC, al menos a las isoformas β (Smrcka y col., 1991; Sternweiss y Smrcka, 1992; Taylor y col., 1991).

G_4 y G_{11} están ampliamente distribuidas en los tejidos, incluido el SNC, además de en múltiples líneas celulares (Milligan, 1993a; Mitchell y col., 1991) y difieren únicamente en un 12% de su secuencia localizándose la mayoría de las diferencias en el extremo amino terminal. Esta zona parece ser importante en determinar la especificidad de la interacción con el complejo $\beta\tau$. G_{14} se encuentra fundamentalmente en células epiteliales y estomáticas mientras que G_{15} y G_{16} se localizan en células hematopoyéticas. Además $G_{15}\alpha$ y $G_{16}\alpha$ presentan sólo un 57% y un 58% de identidad con la $G_4\alpha$. Esta especificidad en su distribución podría significar un función muy especializada de estas proteínas (Hepler y Gilman, 1992).

Clase G_{12}

Incluye las proteínas G_{12} y G_{13} , que se expresan en la mayoría de los tejidos y son resistentes a la modificación por PTX.

1.3.2. Ciclo de activación de las proteínas G

Un receptor de la superficie celular reconoce y une un ligando específico, que puede ser un neurotransmisor endógeno o una sustancia exógena. Una vez unido, este ligando induce un cambio conformacional en el receptor que le lleva a activar una proteína G. Por tanto, el ligando unido al receptor inicia dos procesos; uno que conduce a la pérdida de afinidad por el propio ligando y, otro que comienza con la activación de la proteína G heterotrimérica y que supone la generación de una señal intracelular.

La interacción de la proteína G con el receptor activado promueve la liberación del GDP unido a la subunidad α . La posterior unión del GTP provoca la disociación del complejo α -GTP del dímero $\beta\tau$. Es entonces cuando la subunidad α -GTP y/o los dímeros $\beta\tau$ interaccionan con los efectores (actividades enzimáticas o canales iónicos). El ciclo de activación finaliza cuando la actividad GTPásica intrínseca de la subunidad α hidroliza GTP a GDP. Se produce la liberación de fosfato inorgánico (Pi) y α -GDP, que se vuelve a asociar con el complejo $\beta\tau$ (Gilman, 1987).

Las propiedades de este ciclo se pueden resumir en i) amplificación de la señal: la activación de un único receptor puede activar muchas proteínas G, del mismo modo que la activación de un efector puede generar muchos segundos mensajeros (Gilman, 1987; Taylor, 1992); ii) duración sostenida de la acción: la tasa de hidrólisis de GTP es muy lenta, mucho más que la unión de una hormona a su receptor (Graziano y Gilman, 1989; Landis y col., 1989); y iii) autorregulación: una vez activada la proteína G es capaz de inactivarse mediante la hidrólisis de GTP. Los análogos no hidrolizables del GTP (como el Gpp(NH)p o el GTP γ S) al provocar una persistente disociación del trímero producen una persistente activación de las subunidades α .

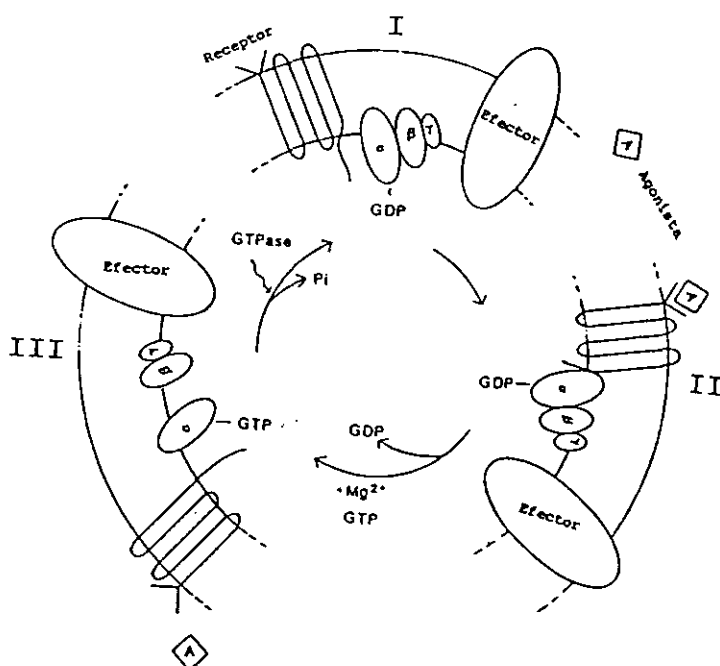


Figura 5. Esquema de la transducción mediada por proteínas G. Un receptor une un agonista lo que provoca un cambio en la interacción entre el receptor y la proteína G. Esto permite que el GTP en presencia de Mg^{2+} sustituya al GDP de la subunidad α . El complejo GTP-subunidad α se disocia del complejo $\beta\gamma$ y uno u otro interactúan con los efectores. La actividad GTPásica intrínseca de la subunidad α hidroliza el GTP a GDP liberando P_i . La subunidad α unida al GDP se vuelve a combinar con el complejo $\beta\gamma$ lo que da por concluido el ciclo de activación.

1.3.3. Modulación de la actividad GTPásica

Mediada por receptores

La activación de las proteínas G se produce tras su interacción con un receptor lo que conlleva la sustitución de GDP por GTP en la subunidad α y la posterior disociación del trímero. Es la actividad enzimática GTPasa, intrínseca de la subunidad α , la que devuelve a las proteínas G a su estado inactivo. Cuando los receptores son activados por agonistas se produce un incremento en la actividad GTPásica como consecuencia del aumento del metabolismo del GTP en GDP y Pi en la subunidad α . Por tanto, la determinación de la actividad GTPásica de una proteína G acoplada a un receptor estimulado por un agonista es reflejo tanto de la inactivación como de la activación de la proteína G promovida por un receptor. Fueron Cassel y Selinger en 1976 estudiando el sistema β -adrenérgico en eritrocitos de pavo los que describieron por primera vez la existencia de una actividad GTPásica de alta afinidad estimulable por agonistas, en su caso por catecolaminas. Desde entonces, la hidrólisis de GTP estimulada por agonistas (ligandos exógenos y endógenos), se ha descrito para múltiples sistemas receptoriales, incluido el opioide, el adrenérgico y el colinérgico, en una gran variedad de membranas (Aktories y Jakobs, 1981; Barchfeld y Medzihradsky, 1984; Clark y col., 1986; Fedynyshyn y Lee, 1989; Franklin y Hoss, 1984; Garzón y col., 1994c; Hilf y Jakobs, 1989; Koski y Klee, 1981; Ueda y col., 1987).

La actividad de las proteínas G y el control de su actividad por nucleótidos de guanina y por receptores activados por agonistas está controlada por el Mg^{2+} mediante un proceso todavía no del todo conocido (Gilman, 1987). Tanto en sistemas reconstituídos con receptores y proteínas G purificados como en preparaciones de membrana, se requieren concentraciones del orden micromolar de este ión para que los receptores controlen la unión e hidrólisis del GTP (Asano y col., 1984; Hilf y Jakobs, 1989). Además de estar controlada por el Mg^{2+} , la hidrólisis de GTP dependiente de receptores activados por agonista está controlada por el ión sodio. Para los primeros receptores en los que se puso de manifiesto este

requerimiento fueron los receptores opiodes de las células híbridas de neuroblastoma glioma NG 108-15 (Koski y col., 1982). El incremento en la hidrólisis de GTP dependiente de la ocupación de receptores por agonistas en presencia del sodio es el resultado de la inhibición de la actividad enzimática basal por el ión, puesto que la estimulación sólo es observable cuando la actividad basal está disminuida. Dos posibilidades pueden considerarse: i) que el sodio disminuya la capacidad de intercambio de nucleótidos de guanina o la actividad hidrolítica de la proteína G, o ii) que el sodio actúe a nivel de los receptores disminuyendo la eficacia del acoplamiento receptor-proteína G. Costa y col. en 1990 en base a que el sodio no altera la proporción de proteínas G que pueden ser activadas por receptores ocupados y, sin embargo regula la interacción entre los receptores y las proteínas G en ausencia de ligando, propusieron que este ión juega un papel muy importante en los mecanismos subyacentes a la interacción entre los receptores desocupados y las proteínas G. Al menos en membranas intactas, puesto que los mismos autores demostraron que los iones sodio no ejercían ningún efecto directo sobre proteínas G purificadas. De estos resultados se concluye que el lugar de actuación del catión no se encuentra en ninguna de las subunidades α , β o γ de las proteínas G. Si, al menos, parte de la actividad GTPásica basal es el resultado de la interacción espontánea entre los receptores desocupados y las proteínas G, el sitio de actuación del sodio es el propio receptor.

No mediada por receptores

El mastoparén, péptido de 14 aminoácidos (Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH₂) que se encuentra en el veneno de la avispa, es un secretagogo no específico en diversas células de mamíferos. Provoca la secreción de histamina en mastocitos, de serotonina en plaquetas, de catecolaminas en las células cromafines y de prolactina en los lactotropos adenohipofisarios. Esta estimulación de la secreción está mediada por proteínas G puesto que se bloquea por tratamiento con PTX (Higashijima y col., 1988; 1990; Mousli y col., 1990a).

El mastoparén incrementa la actividad GTPásica y la tasa de unión de nucleótidos de guanina en proteínas G purificadas, de un modo similar a como lo hacen los receptores activados por agonista (Higashijima y col., 1988; 1990). El efecto es selectivo puesto que es más eficaz en estimular la proteínas G_i y G_o que las G_s y G_t (Higashijima y col., 1988).

A nivel celular, el mastoparén comparte propiedades secretoras con una poliamina, el compuesto 48/80, y con una neuroquinina, la sustancia P, que también promueven la liberación de histamina en los mastocitos. El compuesto 48/80 y la sustancia P activan proteínas G_i y G_o purificadas (Mousli y col., 1990b) en un proceso que se evita con el pretratamiento de las proteínas con PTX o con anticuerpos generados contra el extremo carboxilo terminal de las subunidades α (Weingarten y col., 1990). Se trata de péptidos anfifílicos cuyas secuencias presentan una cadena hidrofóbica larga y una zona rica en residuos positivos, que en respuesta a cambios en el potencial de membrana, podrían interaccionar primero con los residuos negativos de la membrana y luego directamente con el extremo carboxilo terminal de la subunidad α de la proteína G en la cara citoplasmática de la membrana (Higashijima y col., 1988; Mousli y col., 1990a). La carga aniónica de la membrana podría facilitar este proceso puesto que tratamientos con neuraminidasa desensibilizan la respuesta de los mastocitos a estos secretagogos (Mousli y col., 1990b). Otro tipo de compuestos como son los antidepressivos tricíclicos también activan de modo directo proteínas G, purificadas (Yamamoto y col., 1992). Todas estas sustancias podrían compartir con el mastoparén el mismo mecanismo de acción.

Cuando el mastoparén se une a membranas fosfolipídicas forma una α hélice altamente estructurada que expone al medio acuoso los residuos positivos (las tres Lys y el grupo amino terminal). Este motivo estructural también aparece en los bucles intracelulares (i_2 e i_3) de los receptores acoplados a proteínas G, y que parece que son los directamente implicados en la interacción con las proteínas G (Dixon y col., 1987). El mastoparén, la sustancia P y otros péptidos podrían mimetizar la zona del receptor con acumulación de cargas positivas (Higashijima y col., 1988; 1990; Mousli y

col., 1990a). Al estudiar el efecto de análogos del mastoparén sobre la estimulación de la actividad guanilato ciclasa y del sistema de transducción en membranas de pulmón y en cultivos celulares se ha observado que tanto los residuos positivos como la estructura de α hélice son esenciales para desencadenarla (Song y col., 1993; Danilenko y col., 1993).

1.4. Sistemas efectores

A diferencia de lo que se ha descrito para los receptores, los sistemas efectores forman parte de una familia más restringida cuyos miembros presentan grandes diferencias entre ellos. Incluyen enzimas como la AC (Bokoch y col., 1984; Katada y col., 1984; Sternweiss y col., 1981), la PDE específica de cGMP de las células fotorreceptoras (Birnbaumer y col., 1990), la PLC específica de los fosfatidil-inositoles (Sternweiss y Smrcka, 1992; Smrcka y col., 1991; Taylor y col., 1991), la PLA₂ que libera ácido araquidónico; transportadores de Mg²⁺ y posiblemente también de glucosa; y distintas clases de canales iónicos, incluyendo canales de K⁺, de Ca²⁺, y de Na⁺ (Dolphin, 1991; Hescheler y col., 1987; VanDongen y col., 1988; Yatani y col., 1988b). En base a esto, las respuestas provocadas por los mensajeros extracelulares al ocupar receptores acoplados a proteínas G incluyen no sólo cambios en los niveles intracelulares de segundos mensajeros (nucleótidos cíclicos, fosfatidil-inositoles, diacilglicerol, ácido araquidónico o Ca²⁺) sino también cambios en el potencial de membrana. De los tres elementos que constituyen el sistema de transducción, receptores, proteínas G y efectores, los efectores son los menos conocidos en términos moleculares. Estudios de clonaje han identificado ocho isoformas de la AC (Tang y col., 1991), dieciseis isotipos de distintos de la PLC y múltiples tipos de la PLA₂ (Sternweiss y Smrcka, 1992). También hay evidencias de la multiplicidad de canales de Ca²⁺, K⁺ y Na⁺, modulables por proteínas G (Clapham, 1994; Dolphin, 1991).

El sistema efector más estudiado es la AC, que cataliza la conversión de ATP, generalmente asociado al ión Mg²⁺, en el segundo mensajero intracelular AMPc, que amplifica la señal generada por la sustancia

extracelular. De este modo, los niveles de AMPc, controlados por un receptor, regulan la actividad de la proteína quinasa A. Esta proteína quinasa fosforila determinadas proteínas plasmáticas cuya activación promoverá la respuesta celular. Al estudiar la secuencia de la AC se ha observado que es una glicoproteína que presenta dos porciones hidrofóbicas fuertemente ancladas a la membrana plasmática y dos dominios hidrofílicos en los que se encuentran los centros catalíticos, responsables de la unión de nucleótidos (Tang y col., 1992).

Muchos sistemas hormonales (como el muscarínico y el α -adrenérgico) estimulan la actividad de las fosfolipasas asociadas a la membrana. La PLC cataliza la hidrólisis del fosfatidil-inositol difosfato (PIP_2) a inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y a diacilglicerol (DAG), que actúan como segundos mensajeros. El IP_3 regula la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y el DAG estimula la proteína quinasa C, dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos. Además el Ca^{2+} generado puede regular, directamente los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} o, indirectamente mediante la calmodulina, la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina: la fosforilasa B (Birnbaumer y col., 1990). Las secuencias aminoácídicas de las PLC descritas presentan gran similitud en dos regiones, de entre 170 y 260 aminoácidos, que parecen ser esenciales para la actividad catalítica de la enzima. Las homologías que aparecen en el resto de la secuencia se han utilizado para definir a las subfamilias de PLC como β , τ y δ (Sternweiss y Smarcka, 1992). La PLA₂ cataliza la liberación de ácido araquidónico de la membrana celular. Se inicia entonces la cascada del ácido araquidónico que conduce a la producción de los metabolitos prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que más que actuar como mensajeros intracelulares se consideran mensajeros intercelulares.

Los efectos celulares de los segundos mensajeros están mediados por proteínas quinasas que actúan sobre proteínas diana intracelulares, tales como, canales iónicos, transportadores, enzimas glicolíticas, y factores de transcripción, y que generan cambios intracelulares que afectan la transcripción génica, la reorganización del citoesqueleto, los mecanismos de

secreción y la despolarización de la membrana.

En células nativas, distintos receptores responden a la misma hormona o neurotransmisor, sin embargo estos receptores pueden ser de distintos subtipos. Es decir, es imposible determinar si la activación que produce la unión de distintos agonistas sobre distintos sistemas de transducción de señales es consecuencia de su unión a un mismo subtipo de receptor multifuncional o si, por el contrario, es consecuencia de su unión a distintos subtipos de receptores, cada uno de los cuales es específico para las diferentes rutas de transmisión de señales. Para intentar esclarecer en qué punto se produce la bifurcación dentro del sistema de transducción de señales, se expresa un determinado receptor en una célula que normalmente no lo presenta. Estos estudios se complican más si tiene en cuenta que no sólo las subunidades α de las proteínas G tienen efecto sobre los distintos efectores sino que también los dímeros $\beta\gamma$ lo tienen (Sternweiss, 1994), de hecho, se ha descrito que estos complejos modulan efectores distintos a los modulados por las subunidades α e incluso ejercen efectos de signo contrario sobre ellos (Birnbaumer, 1992). En la actualidad se consideran tres posibles mecanismos de bifurcación de las señales generadas por los receptores acoplados a proteínas G (Milligan, 1993c):

Modelo 1. En las células se expresan distintos subtipos de un mismo receptor cada uno de los cuales es capaz de interaccionar con distintas proteínas G, que a su vez interaccionan con distintos efectores.

Modelo 2. Un único receptor es capaz de activar múltiples proteínas G, cada una de las cuales regula un efector distinto.

Modelo 3. Un único receptor interacciona con una única proteína G. La bifurcación de la señal se produce tras la disociación del heterotrímero. La subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ regulan diferentes efectores.

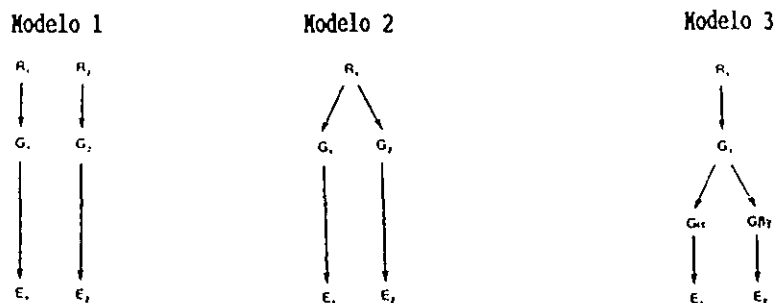


Figura 6. Posibles mecanismos de bifurcación de señales para los receptores mediados por proteínas G.

2. Sistema opioide

2.1. Péptidos opioídes endógenos

En un principio se aplicaba el término "opiáceo" para designar a aquellas sustancias derivadas del opio (morfina, codeína y los derivados semisintéticos de la morfina), sin embargo en la actualidad este término se encuentra en desuso y se ha sustituido por el término "opioide" que se emplea para designar a las sustancias, tanto naturales como sintéticas, con actividad morfínica.

La estimulación eléctrica de ciertas regiones del tronco cerebral produce analgesia en distintas especies animales y en el hombre. La primera zona del SNC donde se describió la existencia de analgesia producida por estimulación eléctrica fue la sustancia gris periacueductal (PAG) (Reynolds, 1969). El mismo efecto se observó cuando se estimulaba la sustancia gris periventricular (Rhodes y Liebeskind 1979) y el núcleo magno del rafe en el bulbo (Fields y Basbaum, 1978). La capacidad de inducir analgesia por la estimulación eléctrica de determinados núcleos del SNC, analgesia que es antagonizada por antagonistas opioídes específicos, estimuló la búsqueda de ligandos endógenos que utilizaran fisiológicamente esos receptores. Así se descubrieron dos pentapéptidos, denominados metionina-encefalina (Met-encefalina) y leucina-encefalina (Leu-encefalina), y un péptido de 31 aminoácidos denominado β -endorfina (β -end), que contiene la secuencia de

Met-enkefalina en el extremo amino terminal. Los tres péptidos son capaces de ocupar selectivamente los receptores opioides, de inducir las acciones farmacológicas propias de la morfina y de ser antagonizados por el antagonista opioide naloxona. Posteriormente se han descubierto otros péptidos de diversa longitud, que se caracterizan por contener siempre en el extremo amino terminal una secuencia de Met- o de Leu-enkefalina. Se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC, SN periférico, tejido cromafín y glándulas endocrinas, en especial en la hipófisis.

Todos los péptidos opioides aislados hasta el momento derivan del procesamiento post-translacional de tres precursores polipeptídicos (Höllt, 1983): la pro-opiomelanocortina (POMC), denominada así porque de ella derivan, entre otros péptidos, la β -end, la ACTH (hormona adrenocorticotropa) y la α -MSH (hormona estimulante de melanocitos); la proencefalina A y; la proencefalina B o prodinorfina. Estos tres polipéptidos son de parecida longitud y se caracterizan por poseer de manera repetida ciertas secuencias de aminoácidos a lo largo de su estructura. La proencefalina A contiene seis copias de Met-enkefalina y una de Leu-enkefalina; la proencefalina B tiene seis copias de Leu-enkefalina; y la POMC presenta tres secuencias de α -MSH (Figura 7).

La POMC es sintetizada tanto en los lóbulos anterior y neurointermedio de la hipófisis como en el cerebro aunque es mucho más abundante en la hipófisis. En el cerebro hay dos grupos distintos de células que contienen péptidos derivados de la POMC. Un grupo celular se localiza en el núcleo arcuado hipotalámico desde donde proyecta sus axones hacia estructuras telencefálicas, diencefálicas, mesencefálicas y del tronco cerebral. En especial estos axones inervan áreas implicadas en la integración nociceptiva y sensorial. Las aferencias llegan, por tanto, hasta estructuras límbicas, talámicas, hipotalámicas y periventriculares (como el PAG) (Bloom y col., 1978; Watson y col., 1977). El segundo grupo de células se encuentra en el núcleo del tracto solitario y parece proyectar hacia áreas implicadas en la regulación de estructuras respiratorias y cardiovasculares (Khachaturian y col., 1985). El procesamiento de la POMC depende de la naturaleza y

localización de las células, por lo que la distribución de los péptidos derivados de la POMC (β -end, ACTH y α -MSH,) no es homogénea en el SNC (Rossier y Bloom, 1979).

Los péptidos derivados de la POMC pueden sufrir posteriormente distintas modificaciones enzimáticas para originar otras formas moleculares, que en el caso de la β -end reducen o abolen completamente su actividad opioide e, incluso provocan la aparición de otras respuestas farmacológicas. Los fraccionamientos proteolíticos en el extremo carboxilo terminal de la β -end originan β -end (1-27), β -end (1-26), τ -end (β -end (1-17)) y α -end (β -end (1-16)) (Smyth y Zakarian, 1980; Zakarian y Smyth, 1982), que junto con la β -end pueden sufrir acetilaciones en el extremo amino terminal. Tanto los fraccionamientos proteolíticos como las acetilaciones eliminan la actividad antinociceptiva de la β -end y reducen su afinidad por los receptores opioides (Deakin y col., 1980; Smyth y col., 1979). Además la generación de las formas τ -end y α -end se ve acompañada de la aparición de actividades neurolépticas y psicóticas (De Wied y col., 1978). Se ha propuesto que la N-acetilación podría ser un proceso metabólico importante para mantener el nivel fisiológico adecuado de actividad opioide tanto en el encéfalo como en la hipófisis (Smyth y col., 1979; Zakarian y Smyth, 1979). Por ello, la actividad de la acetiltransferasa es de gran importancia en el control de la actividad biológica de los productos de secreción. Se ha descrito incluso que la biosíntesis de la POMC y la actividad acetiltransferasa se encuentran correguladas (Millington y col., 1986). La capacidad de las células POMC para secretar péptidos con distinta actividad biológica podría ser importante para los organismos para adaptarse a cambios en el medio ambiente.

A diferencia de la POMC, de la que únicamente deriva un péptido con actividad opioide (β -end), de la proencefalina A derivan varios péptidos con esta actividad: Leu-Enkefalina, Met-Enkefalina, Met-Enkefalina-Arg-Phe, Met-Enkefalina-Arg-Gly-Leu o los péptidos BAM, E y F (Figura 7). Las neuronas que contienen proencefalina A se encuentran ampliamente distribuidas en el SNC, desde la corteza cerebral hasta la médula (Tempel y Zukin, 1987), y son distintas a las células que contienen POMC (Rossier y

col., 1977). Las mayores concentraciones de encefalinas aparecen en el estriado y en el diencefalo, especialmente en el hipotálamo y en el área preóptica, lo que sugiere la participación de estos péptidos en funciones neuroendocrinas. En el mesencéfalo, las células encefalinérgicas se localizan fundamentalmente en el PAG y en el núcleo magno del rafe, es decir en zonas directamente relacionadas con los mecanismos de control del dolor.

La proencefalina B o prodinorfina contiene distintos péptidos con actividad opioide, incluyendo dinorfina A, dinorfina B y α - y β -neoendorfina (Figura 7). Los péptidos derivados de la proencefalina B tienen también una distribución muy amplia en el SNC aunque menos que los derivados de la proencefalina A. Destaca la localización de un grupo de células prodinorfinérgicas, distintas a los corticotropas que sintetizan POMC, en el lóbulo anterior de la hipófisis (Khachaturian y col., 1985).

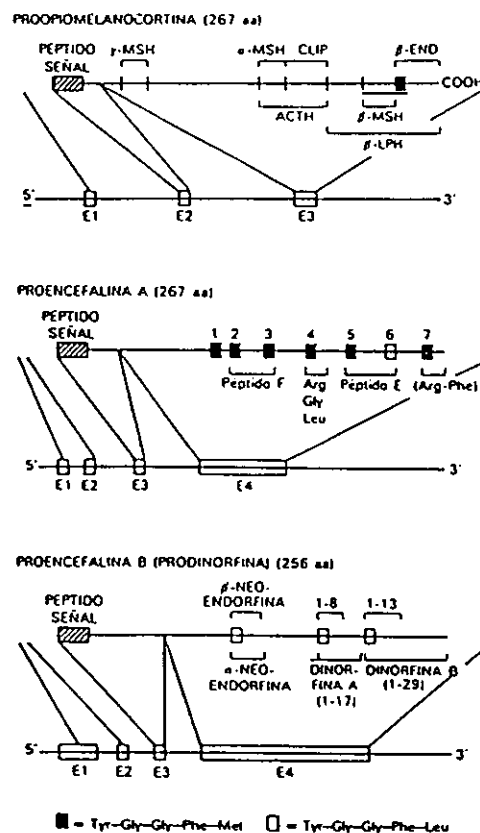


Figura 7. Diagramas de las estructuras de las proteínas y genes de las tres familias de péptidos opioides. En la parte inferior se detallan las secuencias de la Met-enkefalina y la Leu-enkefalina.

Los péptidos opioides endógenos pertenecientes a las tres familias anteriormente descritas presentan afinidades diferenciales por los distintos receptores opioides. La β -end muestra afinidad por los receptores μ , δ y ϵ , pero no por el κ . Los péptidos derivados de la prodinorfina presentan selectividad por los receptores κ y δ (aunque preferencial por los κ). Los péptidos derivados de la proencefalina A muestran afinidad por los cuatro tipos de receptores, pero la afinidad varía en función de la longitud de la cadena (Garzón y col., 1983).

2.2. Receptores opioides

La existencia de receptores opioides quedó demostrada en la década de los 70 por distintos laboratorios (Pert y Snyder, 1973; Simon y col., 1973; Terenius, 1973). En estudios de fijación realizados en homogeneizados de cerebro se observó que estos receptores se localizaban preferentemente en membranas sinápticas (fracciones P_2 y P_3). Dado que ciertas enzimas proteolíticas y diversos agentes modificadores de proteínas reducían la unión específica de radioligandos opioides a esos receptores se concluyó que eran de naturaleza proteica (Pasternak y Snyder, 1974; Simon y col., 1973). Con el descubrimiento de los péptidos opioides endógenos se aceleró el estudio de los receptores opioides. Al estudiar la unión de ligandos a este receptor se observó que la unión era estereoespecífica y sensible a iones y a nucleótidos de guanina (Goldstein y col., 1971; Simantov y col., 1976). Un aspecto particular de este receptor es que la unión de agonistas y antagonistas se altera de forma diferencial por cationes y GTP (Childers y Snyder, 1980).

En base a estudios farmacológicos se han descrito al menos tres tipos distintos de receptores opioides, que se han denominado μ (mu), δ (delta) y κ (kappa) (Lord y col., 1977). Estos receptores presentan diferente afinidad por los distintos ligandos opioides y también diferente distribución autorradiográfica (Mansour y col., 1988). En el vaso deferente de la rata se ha identificado un cuarto tipo de receptor opioide especialmente sensible a la β -end: el receptor ϵ (epsilon) (Garzón y col., 1985). Con el clonaje de los receptores opioides los estudios de distribución de los receptores opioides en

el SNC combinan técnicas autorradiográficas (en los que se observa la fijación específica de ligandos) con la determinación de la expresión de RNAm específicos para cada uno de ellos. En general, existe una buena correlación entre la expresión de los RNAm para los receptores opioides y los sitios de fijación correspondientes, lo que sugiere una síntesis receptorial local (Mansour y col., 1995). Sin embargo, los mismos autores justifican la existencia de áreas en las que la expresión de RNAm no se corresponde con los niveles de fijación en base a i) la alta sensibilidad de las técnicas de hibridación "in situ" en comparación con las técnicas de fijación clásicas en las que se emplean ligandos de baja selectividad y, ii) la existencia de un mecanismo de transporte de receptores, que permitiría su desplazamiento tanto desde los somas hasta los terminales en una misma neurona como su transporte desde un área nerviosa hasta otra. Esta última hipótesis justificaría que en la sustancia nigra se detecte fijación μ y no expresión de RNAm para el receptor μ . Mansour y col. (1995) sugieren que los receptores μ se sintetizan en el estriado y son transportados al mesencéfalo mediante el sistema nigroestriatal.

Los receptores μ , preferentes para compuestos como la morfina, se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC siendo especialmente abundantes en neocorteza, caudado-putamen, septum, tálamo, hipocampo, sustancia nigra, colículos superior e inferior, locus coeruleus, y núcleo del tracto solitario. Las encefalinas son especialmente potentes sobre los receptores δ , que presentan una distribución más restringida que los μ . Destacan por su abundancia en estructuras encefálicas rostrales tales como neocorteza, caudado-putamen y amígdala. Los receptores K, denominados así por constituir los sitios de fijación de los compuestos semejantes a la ketociclazocina, son los receptores preferentes de los péptidos derivados de la prodinorfina y presentan un tercer patrón de distribución en el SNC con sitios localizados en el área preóptica, hipotálamo, eminencia media, caudado-putamen, amígdala y núcleo del tracto solitario. Aunque se detecta un cierto grado de solapamiento en la localización de cada uno de los receptores, su distribución anatómica concreta varía. A la vista de esta distribución se puede asumir que el receptor μ se encuentra en áreas relacionadas con el

control de la sensación nociceptiva e integración sensorial y motora; el receptor δ , que también participa en el control nociceptivo y en la modulación de sistemas endocrinos, presenta una localización más restringida siendo especialmente abundante en las áreas más rostrales del encéfalo. Y, por último, la distribución del tipo K es consistente con su participación en la regulación de la ingesta, equilibrio hídrico, control de la temperatura corporal, motilidad gastrointestinal, percepción de la sensación dolorosa y función neuroendocrina.

Se ha propuesto la existencia de dos subtipos distintos de receptor μ . El μ_1 une opioides y encefalinas con alta afinidad mientras que el μ_2 lo hace de modo preferencial a la morfina (Goodman y Pasternak, 1985; Pasternak y Wood, 1986). El primero de ellos se ha postulado que media la analgesia opioide supraespinal, mientras que el μ_2 es el responsable de los efectos secundarios que acompañan a la administración de opioides, tales como depresión respiratoria, inhibición del tránsito intestinal y dependencia física (Bodnar y col., 1988; Connelly y col., 1994; Raffa y Chupsky, 1993). β -funaltrexamina (Ward y col., 1982) y naloxonacina (Wolozin y Pasternak, 1981) son antagonistas irreversibles para los receptores μ y μ_1 , respectivamente. Otros antagonistas de los receptores μ son, el análogo de la somatostatina: CTOP (Cys², Tyr³, Orn⁵, Pen⁷ Amida), y la naloxazona, antagonista selectivo para el subtipo μ_1 (Gulya y col., 1986).

Recientemente se ha descrito la participación de distintos subtipos del receptor δ (δ_1 y δ_2) en la regulación de la antinocicepción en el ratón. El antagonista selectivo de los receptores δ , el ICI 174864 (Cotton y col., 1984), no es capaz de discriminar ambos subtipos. El subtipo δ_1 se localizaría fundamentalmente en el cerebro y tendría como agonista específico al péptido DPDPE mientras que el subtipo δ_2 sería de localización espinal y la [D-Ala²]-Deltorfina II sería su agonista preferencial (Mattia y col., 1992; Takemori y Portoghese, 1993). Con el desarrollo de antagonistas selectivos no peptídicos para los subtipos δ_1 y δ_2 (tales como el hidrocloreuro de benzilidene-naltrexona o BNTX y el naltribén o NTB, respectivamente) se está avanzando en la caracterización farmacológica de los receptores δ (Sofuoglu y col.,

1991).

Con anterioridad y dada la capacidad de los agonistas δ para modular la antinocicepción μ (Porreca y col., 1992; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989) se había considerado la hipótesis de la existencia de complejos receptoriales formados fundamentalmente por receptores μ y δ entre los se podrían establecer interacciones (Rothman y col., 1988). El modelo propuesto define la existencia de receptores δ como tales (δ_{ncx} , no asociados al complejo) y de receptores δ asociados al complejo (δ_{cx}) (Xu y col., 1993).

En base a estudios de fijación los receptores opioides K se han clasificado en tres subtipos: K_1 , K_2 y K_3 . Los K_1 fijan preferentemente ketociclazocinas, los K_2 que presentan baja afinidad por estas sustancias, y los sitios K_3 , que en condiciones muy restrictivas para la fijación tipo K, son marcados selectivamente por la naloxona benzoilhidrazona (Yasuda y col., 1994). La nor-binaltorfimina es un antagonista altamente selectivo de los receptores opioides K (Portoghese y col., 1987).

Los receptores opioides se encuentran acoplados negativamente al sistema enzimático de la AC, inhibiendo la formación intracelular de AMPc, y también controlan la apertura de canales de calcio y potasio (Di Chiara y North, 1992; Hescheler y col., 1987; North y col., 1987). En este proceso participan las proteínas transductoras G sensibles a la toxina pertúsica G_i y G_o . Estudios recientes han puesto de manifiesto, que al menos en las células híbridas NG 108-15, la activación de los receptores opioides conduce a la estimulación de la PLC (Jin y col., 1994). Con el descubrimiento de subtipos de receptores opioides se ha planteado la cuestión de si los distintos subtipos de un mismo receptor utilizan el mismo sistema de transducción.

El reciente clonaje de los receptores μ (Chen y col., 1993; Min y col., 1994; Thompson y col., 1993; Wang y col., 1993), δ (Abood y col., 1994; Evans y col., 1992; Fukuda y col., 1993; Kieffer y col., 1992) y K (Li y col., 1993; Yasuda y col., 1993) facilitará los estudios moleculares dirigidos a profundizar en el conocimiento de sus distintas propiedades funcionales,

del sistema de transducción que emplean y en el desarrollo de ligandos específicos para cada uno de ellos. Existen evidencias farmacológicas que sugieren que los receptores opioides μ , δ y κ clonados tienen perfiles farmacológicos similares a los subtipos μ_1 , δ_2 y κ_1 (Lai y col., 1994; Raynor y col., 1994; Uhl y col., 1994; Yasuda y col., 1994). Los estudios farmacológicos realizados con los receptores clonados han revelado que los compuestos con capacidad altamente adictiva tales como morfina, fentanil y metadona, presentan una alta afinidad por el receptor μ clonado pero muy poca por los receptores δ o κ (Raynor y col., 1994).

Los receptores opioides, que son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, presentan siete dominios transmembranares y comparten un alto grado de semejanza en su secuencia aminoacídica con aproximadamente el 50% de sus residuos idénticos (Figura 8).

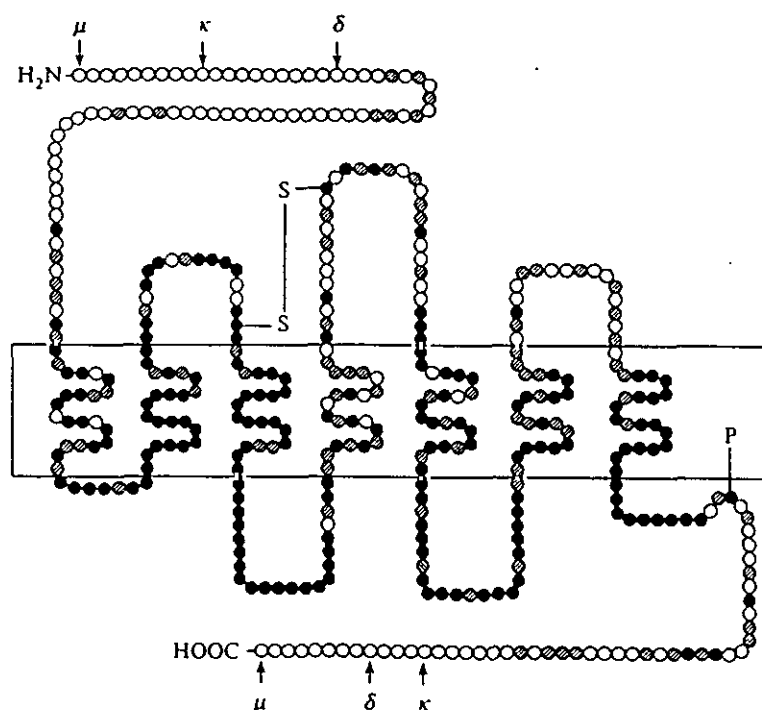


Figura 8. Diagrama de la estructura proteica de los receptores opioides. El extremo amino terminal es extracelular mientras que el carboxilo terminal es intracelular. Estos extremos para cada uno de los tres receptores se señalan con flechas que también indican el nombre del receptor. La membrana lipídica se representa como un rectángulo vacío. También se señalan un posible sitio de palmitoilación y un puente disulfuro. \bullet , residuos idénticos entre los tres receptores; \circ , residuos idénticos en dos de ellos y; \emptyset , residuos únicos para cada receptor.

El receptor δ se ha clonado en la rata y en el ratón. Su cDNA codifica para una proteína de 372 aminoácidos, que presenta un 97% de identidad de secuencia entre los receptores δ de las dos especies. Conserva también un alto grado de homología con los receptores de somatostatina. El receptor K se trata de una proteína de 380 aminoácidos que comparte un 61% de identidad aminoacídica con el receptor δ de la rata y un 70% con el del ratón. Se le relaciona con el ciclo de los fosfatidilinosítoles y con la inhibición de la actividad de los canales de Ca^{2+} . La secuencia del receptor μ de la rata tiene 398 aminoácidos y presenta entre un 57-68% de homología de secuencia con los receptores δ y K del ratón, respectivamente.

Las regiones más conservadas entre los tres receptores son los dominios transmembranarios II, III y VII, el primer bucle extracelular e_1 y los bucles intracelulares i_2 , i_3 e i_4 . La gran similitud de secuencias en estas áreas sugiere que podrían estar implicadas en la unión del ligando (II, III, VII y e_1), acoplamiento a las proteínas G (i_2 e i_3) y regulación del receptor, es decir, a aquellas propiedades comunes a los tres tipos de receptores opioides. Estas similitudes justificarían el solapamiento en la unión de ligandos entre los tres receptores y la interacción con las mismas proteínas G.

Los dominios transmembranarios I, IV-VI, los bucles extracelulares e_2 y e_3 , así como los extremos amino y carboxilo terminal son los que presentan más divergencias entre los tres receptores. En los extremos amino y carboxilo terminal las diferencias se dan tanto en la secuencia aminoacídica como en longitud de la misma. Esto significaría que tanto los extremos amino terminal como las regiones extracelulares participan en la discriminación de los ligandos. Una característica de los receptores opioides es la existencia de sitios potenciales de glicosilación en los extremos amino terminales. En los receptores δ y K aparecen dos sitios de glicosilación mientras que en el receptor μ se dan cinco. Por tanto, dependiendo del grado de glicosilación los receptores opioides pueden presentar diferentes pesos moleculares.

2.3. Acciones fisiológicas de los opioides. Participación en los mecanismos adaptativos que conducen a la tolerancia-dependencia

En general la respuesta de una neurona a la acción de un opioide se caracteriza por i) inhibición de la actividad bioeléctrica, y ii) inhibición de la liberación del neurotransmisor en el que esa neurona se ha especializado. Estudios electrofisiológicos han demostrado que los opioides al reducir el ritmo de descarga de las neuronas reducen la cantidad de neurotransmisor liberado. Los opioides, al actuar sobre los receptores μ y δ , aumentan la conductancia de potasio, por consiguiente la membrana se hiperpolariza dificultándose la producción y/o propagación del potencial de acción, que es el responsable de la liberación del neurotransmisor presináptico (North, 1986). El receptor K al activarse reduce la entrada de calcio al interior celular dificultando la liberación del neurotransmisor (Werz y McDonald, 1985).

Uno de los efectos más relevantes de los opioides es la analgesia. Su elevada potencia y selectividad para reducir la sensibilidad nociceptiva sin alterar otras sensaciones los hacen extremadamente útiles en el tratamiento del dolor de alta intensidad. En la transmisión de la sensación dolorosa participan vías aferentes que conducen los estímulos sensitivos periféricos hasta la médula y/o centros superiores supraespinales del SNC, donde la sensación nociceptiva se integra, y desde donde parten vías descendentes de respuesta que modulan a su vez la información nociceptiva (la estimulación eléctrica de ciertas regiones produce analgesia). Actualmente se acepta que los tres tipos de receptores opioides están implicados en el control de la sensación dolorosa. Sin embargo, aún no está bien definida la importancia relativa de cada tipo de receptor en la respuesta frente a diferentes estímulos (térmicos, de presión...). A nivel supraespinal el receptor μ es el principal responsable de la analgesia opioide, si bien el receptor δ puede mediar un grado moderado de antinocicepción (Porreca y col., 1992; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989). Los opioides, además de participar en los mecanismos de transmisión y control de la sensación nociceptiva, se encuentran implicados en otras acciones relacionadas con la regulación de la actividad motora, con

la termorregulación, con procesos emocionales, con la regulación de la ingesta, de la presión arterial, de la respiración, etc (Olson y col., 1991; 1992; 1993).

La administración continuada de sustancias opioides en los mamíferos conduce a la aparición de tolerancia a estas sustancias que se manifiesta por una disminución en la respuesta a dicha sustancia (por lo que hay que aumentar la dosis para conseguir el mismo efecto) y se acompaña de dependencia física caracterizada por una acusada respuesta a los antagonistas y por la aparición de alteraciones comportamentales (síndrome de abstinencia) tras la retirada de la sustancia. Los estudios realizados en órganos periféricos, en especial en el plexo mientérico de cobaya, y en células de origen neuronal en cultivo (Collier, 1980; Sharma y col., 1975) han hecho posible establecer el mecanismo por el cual se desarrolla la tolerancia-dependencia a los opioides.

Existen evidencias que sugieren que las alteraciones en los receptores opioides o en la liberación de neurotransmisores (Bhargava y Gulati, 1990; Werling y col., 1989) podrían ser las responsables de la aparición de estos fenómenos. En este sentido, desde el descubrimiento de los péptidos opioides endógenos se les ha intentado asignar un papel en los procesos de tolerancia-dependencia y de abstinencia dado que la administración crónica de morfina se asocia con cambios en la síntesis y/o secreción y el procesamiento de las prohormonas proopiomelanocortina, proencefalina A y prodinorfina (Bronstein y col., 1990; García de Yébenes y Pelletier, 1993; Gudehithlu y col., 1991; Rattan y col., 1992; Romualdi y col., 1993).

Sin embargo los cambios que se producen más allá del receptor, es decir, en el sistema de transducción y en los segundos mensajeros podrían también justificar la aparición de estos cambios adaptativos. La administración crónica de opioides de células híbridas NG 108-15 y en el locus coeruleus conduce a una hipertrofia del sistema productor de AMPc (Nestler, 1992; Sharma y col., 1975). Esta hipertrofia del sistema productor de AMPc se considera responsable de la dependencia opioide y podría ser la respuesta

adaptativa de las células a las señales inhibitorias que los receptores opioides activados envían a la AC. Apoyando esta hipótesis se encuentran los trabajos realizados con inhibidores de la PDE (teofilina, cafeína o IBMX), que producen acumulación de AMPc al inhibir su metabolismo. Estos compuestos al ser administrados antes que el antagonista naloxona son capaces de producir un cuadro de retirada-síndrome de cuasi-abstinencia semejante al que se observa en la dependencia morfínica (Francis y col., 1986; Lérída y col., 1989).

Es así mismo posible que la hipertrofia del sistema productor de AMPc podría induzca cambios en la expresión génica, que se encuentra en gran medida modulada por proteínas quinasas dependientes de AMPc (Nestler, 1992). Esta hipótesis justificaría las modificaciones observadas en los niveles de RNAm de las distintas prohormonas opioides tras la administración crónica de morfina (Bronstein y col., 1990; García de Yébenes y Pelletier, 1993; Romualdi y col., 1993).

3. Antecedentes y objetivos del trabajo

Las proteínas transductoras o proteínas G desempeñan un papel esencial en la mediación de los efectos fisiológicos y farmacológicos de la mayoría de los receptores para hormonas y neurotransmisores. Transmiten la información desde los receptores, situados en el exterior de la membrana celular, hasta los efectores intracelulares ya sean éstos enzimas o canales iónicos. Los receptores opioides μ y δ se encuentran acoplados negativamente al sistema enzimático de la adenilato ciclasa por lo que inhiben la formación intracelular de AMPc. Los receptores opioides también controlan la apertura de canales de calcio y potasio (Di Chiara y North, 1992; Hescheler y col., 1987). En este proceso median las proteínas transductoras G sensibles a la toxina pertúsica G_i y G_o (Laugwitz y col., 1993; Ueda y col., 1988).

En el laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Cajal el estudio del sistema opioide es un objetivo prioritario, por ello el presente trabajo se diseñó con el objeto de profundizar en el conocimiento, i) de la adaptación del

sistema opioide endógeno frente a los tratamientos crónicos con opioides y; ii) del sistema de transducción asociado a los receptores opioides μ y δ . En la realización del trabajo se han empleado dos técnicas experimentales, el radioinmunoensayo para determinar niveles de péptidos opioides endógenos, y la cuantificación de la actividad GTPásica de alta afinidad asociada a las subunidades α de las proteínas G, técnica que permite estudiar la comunicación entre los receptores opioides y el sistema de transducción.

La exposición continuada de un sistema celular a un agonista provoca fenómenos adaptativos en las células que afectan tanto a los receptores implicados (Law y col., 1982; Vachon y col., 1987), como al sistema de transducción que éstos emplean (Ammer y Schulz, 1993; Milligan, 1993; Milligan y Green, 1991). Estos fenómenos forman parte de los procesos que conducen a la aparición de tolerancia y dependencia. En este trabajo se ha abordado el estudio del fenómeno de la tolerancia-dependencia a opioides desde dos aproximaciones experimentales. Por una parte, se han estudiado los cambios que la presencia crónica de morfina y la posterior retirada del opioide provocan en los niveles de los dos péptidos opioides endógenos β -endorfina (1-31) y su derivado 3 N-acetilado en el SNC de la rata y el ratón. Y por otra, de qué modo el tratamiento crónico con la morfina afecta a las relaciones entre los receptores opioides y las proteínas transductoras G en el SNC del ratón. En la bibliografía se encuentran ampliamente documentados los cambios que se producen en los niveles de β -endorfina (1-31) y en la expresión de los sistemas opioides derivados de la pro-opiomelanocortina en animales tolerante-dependientes a opioides y con síndrome de abstinencia (Bronstein y col., 1990; García de Yébenes y Pelletier, 1993; Gudehithlu y col., 1991), sin embargo, los efectos que estas situaciones experimentales provocan sobre su derivado N-acetilado no habían sido estudiados en profundidad.

El establecimiento de un perfil de distribución para la β -endorfina (1-31) y para la N-acetil- β -endorfina (1-31) en el SNC de la rata y del ratón, las dos especies que más se utilizan en la investigación de opioides, y los cambios que se producen en dicho perfil en situaciones de tolerancia-

dependencia y de abstinencia a opioides es de gran importancia ya que se ha propuesto a la N-acetil- β -endorfina (1-31) como un regulador de carácter no competitivo sobre el receptor opioide μ . Este neuropéptido que presenta baja afinidad por los receptores opioides (Deakin y col., 1980) y carece de actividad analgésica cuando se inyecta i.c.v. en roedores (Smyth y col., 1979) atenúa la severidad del síndrome de abstinencia en el ratón (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1992) y regula los efectos antinociceptivos de diferentes opioides, entre ellos la β -endorfina (1-31), DAGO y morfina (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1991; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1992a; 1993a).

Las subunidades G_s son enzimas que unen e hidrolizan GTP. Aunque la tasa de hidrólisis de GTP es lenta (Gilman, 1987), es posible determinar la actividad GTPásica de membranas plasmáticas debido a la alta concentración de proteínas G existente en ellas. También es posible medir la estimulación de la hidrólisis de GTP mediada por el receptor, ya que cuando un agonista se une a un receptor se estimula el intercambio de GDP por GTP. La técnica de determinación de la actividad GTPásica fue descrita por primera vez en eritrocitos de pavo por Cassel y Selinger en 1976, en la actualidad el método sigue siendo válido aunque se han realizado algunas modificaciones para mejorar el rendimiento. La medida de la actividad GTPásica mediada por proteínas G se lleva a cabo introduciendo en el ensayo el trazador radiactivo $\tau[^{32}\text{P}]\text{GTP}$ que compite con el GTP sin marcar y que constituye el sustrato de la reacción. En el medio de incubación, además de las membranas a estudiar, se encuentran presentes un inhibidor de las nucleósido trifosfatasa no específicas, un sistema regenerador de ATP (para disminuir la transferencia del ^{32}Pi liberado al ADP), un inhibidor de la ATPasa de Na^+/K^+ , MgCl_2 (necesario para la actividad catalítica de las proteínas G) y NaCl (imprescindible para atenuar las interacciones que se producen entre los receptores desocupados y las proteínas G). Al producirse la hidrólisis, se libera ^{32}Pi que puede medirse por contaje radiométrico tras su separación del $\tau[^{32}\text{P}]\text{GTP}$ no hidrolizado.

Koski y Klee (1981) demostraron que los opioides, en un proceso mediado por receptor, estimulan la actividad GTPásica de baja Km en la línea celular de neuroblastoma x glioma NG 108-15 y que dicha activación se correlaciona con la inhibición de la enzima adenilato ciclasa. Por tanto, la estimulación de la GTPasa de baja Km provocada por agonistas en membranas refleja los acontecimientos que se producen inmediatamente a continuación de la activación del receptor por la unión de un agonista. Trabajos posteriores demostraron que los opioides también estimulan la actividad GTPásica de baja Km (o de alta afinidad) en el SNC de la rata (Franklin y Hoss, 1984; Fedynyshyn y Lee, 1989). Franklin y Hoss (1984) pusieron de manifiesto que la GTPasa de baja Km en el SNC de rata presenta una distribución diferencial, posiblemente atribuible a, i) la distribución no homogénea de los distintos tipos/subtipos de G_o en el cerebro de la rata (Orford y col., 1991) y, ii) la diferente tasa de unión y liberación de nucleótidos de guanina por las distintas subunidades G_o (Carty y col., 1990; Linder y col., 1990).

En este estudio se eligió el SNC de ratón para llevar a cabo el análisis del sistema de transducción ya que es la especie más frecuentemente utilizada en la investigación de los efectos centrales de los opioides. Se trata de un trabajo pionero en el que se caracteriza la actividad GTPásica de alta afinidad en el SNC de ratón. En la mayoría de los experimentos se ha utilizado la sustancia gris periacueductal (PAG) dada su estrecha relación con los centros que median la analgesia opioide supraespinal (Herz y col., 1970), sin embargo, como en el efecto antinociceptivo de los opioides parecen estar implicadas tanto estructuras supraespinales como espinales (Takemori y Porthoghese, 1993) en algunos casos también se han empleado preparaciones de médula espinal. Se ha realizado un estudio en paralelo en cultivos de células híbridas de neuroblastoma x glioma NG 108-15, en las que la mayoría de los autores describen un único tipo de receptores opioides, el δ . En una primera etapa se procedió a caracterizar la actividad GTPásica de baja Km en diferentes áreas del SNC del ratón, posteriormente se pudo establecer el patrón de activación de diferentes agonistas opioides sobre la GTPasa en esas estructuras.

Con el desarrollo de las técnicas de clonaje molecular se han identificado múltiples familias de receptores, de proteínas G y de efectores. La generación de antisueros selectivos frente a las distintas subunidades α de las proteínas G o frente a los distintos receptores opioides es una de las aproximaciones experimentales más comúnmente utilizadas en el estudio de los subtipos de proteínas G o de los receptores que se encuentran en una determinada preparación (Berti-Mattera y col., 1992; Canlon y col., 1991; Garzón y col., 1994c; Young y col., 1993). La administración "in vivo" de antisueros se ha revelado como un método eficaz de estudio de la antinocicepción opioide y de las relaciones que se dan entre el sistema de transducción y los receptores (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1994c; Sánchez-Blázquez y Garzón 1993b; Garzón y col., 1994a; 1994d; Sánchez-Blázquez y col., 1993). Esta técnica se enfrenta, sin embargo, a la dificultad de generar antisueros específicos dada la alta conservación de las secuencias que codifican para cada una de las subunidades G_α (Jones y Reed, 1987). La administración de oligodesoxinucleótidos antisentido que bloquean la síntesis de las subunidades α de las proteínas G o de los receptores opioides se utiliza para estudiar, i) la funcionalidad de un receptor en ausencia de un subtipo de proteína transductora o, ii) la antinocicepción que permanece en ausencia de un determinado receptor, respectivamente. Los oligodesoxinucleótidos han demostrado ser eficaces tanto si se administran "in vivo" (Raffa y col., 1994; Tseng y col., 1994) como si se incorporan por microinyección nuclear a células en cultivos (Kleuss y col., 1993).

Para establecer qué tipo de proteínas G, qué receptores opioides participan en la activación de la actividad GTPásica por distintos agonistas opioides o, qué cambios se producen en la relación agonista-receptor cuando un determinado subtipo de proteína G se encuentra ausente, se procedió a estudiar la modificación de la actividad GTPásica de alta afinidad sensible a opioides en el SNC de ratón producida por i) antisueros específicos generados frente a las subunidades G_α o, por ii) antisueros generados frente a los receptores opioides μ y δ . Para ello, antes de proceder a la determinación de la actividad GTPásica según el método descrito anteriormente, se preincubaron los antisueros selectivos purificados por

afinidad con los tejidos siguiendo los protocolos descritos en la bibliografía (McClue y col., 1992; McKenzie y Milligan, 1990; McKenzie y col., 1988). Con respecto a las subunidades G_α , analizamos la participación de las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{s/x}\alpha$, que parecen ser las más implicadas en la antinocicepción supraespinal a través del receptor μ , del que la morfina es preferencial (Raffa y col., 1994; Sánchez-Blázquez y col., 1993). El estudio de la eficacia de los distintos agonistas sobre los receptores opioides se realizó en los tipos μ y δ .

Atendiendo a estas consideraciones se fijaron los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar el perfil de distribución de los péptidos endógenos β -endorfina (1-31) y su derivado "N-acetilado en el SNC de la rata y el ratón y, estudiar la modificación de este patrón de distribución en situaciones de tolerancia y dependencia a opioides y de síndrome de abstinencia. Se utilizó la técnica del radioinmunoensayo en el cual se empleó un antisuero generado frente a la secuencia completa de la β -endorfina humana (1-31).
- 2.- Establecer la distribución de la actividad GTPásica de alta afinidad en distintas estructuras del SNC de ratón, para a continuación evaluar el efecto de la administración crónica de morfina sobre dicha actividad enzimática.
- 3.- Estudiar la sensibilidad a los opioides de la actividad GTPásica de alta afinidad mediada por los receptores opioides μ y δ en distintas áreas del SNC de ratón y en la línea celular híbrida neuroblastoma x glioma NG 108-15, portadora únicamente del tipo δ . En una primera etapa se estableció la respuesta producida por los agonistas opioides: morfina (preferente del receptor μ), DAGO (selectivo del receptor μ), DPDPE (selectivo del receptor δ), [D-Ala²]-Deltorfina II (selectivo del receptor δ), DADLE (agonista δ/μ) y β -endorfina (1-31) (agonista μ/δ). Posteriormente se procedió a analizar la modificación de la actividad enzimática GTPasa sensible a esos opioides por antisueros generados frente a los receptores opioides μ y δ .

4.- Determinar la participación de las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{s/\alpha}$ en la estimulación por agonistas opioides de la actividad GTPásica de baja Km en el SNC de ratón. Para ello, una vez establecido el patrón de estimulación de la actividad GTPásica por los distintos agonistas se estudió la modificación de este patrón por la presencia de antisueros generados frente a las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{s/\alpha}$.

5.- Evaluar la capacidad de estimulación sobre la actividad GTPásica de baja Km del SNC de ratón de ciertos agentes reguladores de la función opioide como son el veneno peptídico mastoparén y el neuropéptido N-acetil- β -endorfina (1-31).

MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

1.1. Animales

Se utilizaron ratones macho, variedad albina, de la cepa Swiss CD-1 (22-27g) (Charles River, Barcelona) así como ratas macho, variedad albina, raza Wistar (250-300g) procedentes del animalario del instituto. Los animales procedentes del exterior permanecieron en nuestro estabulario durante un periodo de al menos 4 días antes de su utilización. Los animales no habían sido sometidos previamente a ningún ensayo y se mantuvieron a una temperatura ambiente de $20\pm 3^{\circ}\text{C}$. Dispusieron de agua y comida "ad libitum" (dieta estandar, Interfauna C.R.M.) y los ciclos de luz/oscuridad se sucedieron regularmente cada 12h (siendo el periodo de luz de 7:00 a.m. a 7:00 p.m.). También se utilizaron conejos, variedad albina, raza New Zealand (Biocentre, Barcelona), para generar los antisueros necesarios. Estos animales se mantuvieron en las mismas condiciones de estabulación a las descritas para los ratones y las ratas.

Tanto la estabulación como la utilización de los animales se realizó siguiendo la normativa vigente en la Comunidad Europea sobre el uso y experimentación con animales de laboratorio.

1.2. Cultivos celulares

Las células híbridas de la línea celular neuroblastoma-glioma NG 108-15 provenían del laboratorio del Prof. R. Schulz (Instituto de Farmacología, Toxicología y Farmacia, Universidad de Munich, Alemania). Se crecieron a 37°C en atmósfera humidificada al 5% CO_2 en frascos (Nunc) de 75cm^2 con 25 ml de medio de cultivo que se renovaba cada 2/3 días. El medio empleado fue "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM) conteniendo suero fetal bovino 5%, HAT 2% (hipoxantina $100\mu\text{M}$, aminopterina $1\mu\text{M}$ y timidina $16\mu\text{M}$) y suplementado con penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina $100\mu\text{g/ml}$, y L-glutamina 1%.

1.3. Reactivos

Los fármacos y productos químicos utilizados así como la procedencia de éstos se detalla a continuación. Los péptidos sintéticos β -endorfina humana (1-31) (β -end), N-Acetil- β -endorfina humana (1-31) (NAC), β -endorfina humana (1-27), β -endorfina humana (6-31), τ -endorfina (β -endorfina 1-17), metionina-encefalina, mastoparén, Cys², Tyr³, Orn⁵, Pen⁷ amida (CTOP), [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina (DAGO), [D-Ala², D-Leu⁵]-encefalina (DADLE), [D-Pen^{2,5}]-encefalina (DPDPE), [D-Ala²]-Deltorfina II y la secuencia peptídica EEQGMLPEDLS (residuos 115-125 de la subunidad α_{12}) se adquirieron a Peninsula Laboratories (San Carlos, CA, USA). Las secuencias peptídicas C-TGPAESKGEITPELL (residuos 111-125 de la subunidad $\alpha_{1,4}$), C-MELVPSARAEQLQSSPL (residuos 1-16 del receptor opioide δ), MDSSTGPGNTSDCSDP (residuos 1-16 del receptor opioide μ) y CTKYRQGSID (residuos 208-216 del receptor opioide μ) fueron sintetizados por BioSynthesis (Madrid). [¹²⁵I]-Tyr²⁷ β -endorfina humana (I.M.162, 2000 Ci/mmol) procedió de Amersham (Buckinghamshire, UK). [³²P]GTP (NEG-004Z, 6000 Ci/mmol) se obtuvo de Du Pont de Nemours (Dreiech, Alemania). La morfina base se obtuvo del Ministerio de Sanidad y Consumo. La morfina-HCl se adquirió a Merck (Darmstadt, Alemania). Naloxona, arlacel A, marcol 52, aceite mineral, albúmina de suero bovina (BSA), tiroglobulina bovina, hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), tween 20, timerosal, ditiotretitol, 5'-trifosfato de adenosina (ATP), fosfato de creatina, creatina fosfoquinasa, ouabaina, 5'-trifosfato de guanosina (GTP), 5'(β , τ ,imino) trifosfato de adenosina [App(NH)p], idazoxán, (-)-bicuculina se adquirieron a Sigma (San Louis, MO, USA). [N,N-dialil-Tyr-(ácido α -aminoisobutírico)₂-Phe-Leu-OH] (ICI 174864) se obtuvo de CRB (Cambridge, UK). Nor-binaltorfimina (Nor-BNI), S(-)-sulpiride, hidrocloreto de benzilideno-naltrexona (BNTX) y naltribén metanosulfonato (NTB) se adquirieron a RBI (Natick, MA, USA). Glicerol, dodecilsulfatosódico (SDS), 2'-mercaptoetanol, glicina, ácido clorhídrico, ácido acético, trietanolamina, acetonitrilo y demás productos químicos, se adquirieron a Merck (Darmstadt, Alemania).

2. Métodos

2.1. Tolerancia y dependencia a la morfina

La implantación subcutánea de morfina se utiliza como procedimiento habitual para inducir tolerancia y dependencia a la administración crónica de este alcaloide en diferentes especies animales (Maggiolo y Huidobro, 1961).

2.1.1. Administración crónica de morfina

En el caso del ratón, la tolerancia se indujo por la administración subcutánea (s.c.) de una preparación de cesión lenta de morfina (Christie y col., 1984), que en este trabajo la hemos denominado suspensión de morfina. Ofrece a priori varias ventajas sobre la implantación de los comprimidos tradicionales. En primer lugar, su administración no requiere anestesia ni trauma quirúrgico. Por otra parte, la individualización de la dosis con respecto al peso del animal resulta más sencilla, y por último, tanto la manufactura como la administración del preparado resultan más fáciles. Este método además proporciona unos niveles muy constantes del opiáceo en plasma durante al menos 3 días (Blasig y col., 1973). La suspensión de morfina se administró en un volumen de 10 ml/Kg de peso, lo que representa una dosis de morfina de 1 g/Kg, idéntica a la empleada por Christie y col. (1984) para el estudio de la tolerancia a la morfina en el ratón. La composición de dicha suspensión de morfina es de 1g/10 ml de morfina base, 42.5% aceite mineral, 7.5% arlacel A en solución salina al 0.9%. La mortalidad inducida en el ratón por el tratamiento con la suspensión de morfina es muy baja en comparación con la que provoca la implantación de los comprimidos.

Para inducir tolerancia en la rata, se implantaron s.c. minibombas osmóticas ALZET (modelo 2001, ALZA Corporation), que contenían una solución de 10 µg/µl de morfina-HCl. La implantación de estas minibombas ha demostrado ser un método eficaz en la inducción de tolerancia (Adams y Holtzman, 1990). Estas minibombas tienen una capacidad de aproximadamente 200 µl (235±17 µl) y mantienen un flujo constante de liberación de 1 µl/h,

durante 7 días. De este modo no se producen oscilaciones en los niveles de morfina en plasma y tejidos y se evitan las altas concentraciones de morfina que se detectan entre las 4 y 6h en el plasma de animales implantados con el comprimido tradicional, y que son las responsables de la mortalidad (Yoburn y col., 1985). Las ventajas que presenta la implantación de minibombas frente a la administración de la suspensión de morfina es que no hay tener ninguna precaución especial con los animales tras la administración del opioide puesto que al ser éste liberado a flujo constante, el riesgo de depresión respiratoria (que la morfina provoca si se administra en grandes cantidades) prácticamente no existe.

La minibomba consta de un depósito de llenado revestido de material flexible e impermeable que se encuentra rodeado por una capa de gel osmótico. Todo ello está incluido en una membrana semipermeable de éster de celulosa. Cuando la minibomba llena se coloca en un medio húmedo, el agente osmótico embebe agua a un ritmo controlado por la membrana semipermeable. El agua genera una presión hidrostática sobre el revestimiento comprimiéndolo y produciendo, por tanto, la salida de su contenido a un flujo constante. La minibomba osmótica tiene un regulador de flujo que consta de un capuchón desmontable, una pestaña de cierre y un conducto de acero inoxidable. Para utilizarla correctamente hay que manipularla con cuidado para no obturar los poros de su superficie, así como asegurarse de que la sustancia a liberar sea estable y soluble a 37°C en el vehículo de la disolución. El llenado de la minibomba se realiza con una jeringa y aguja adecuadas, que penetran en el depósito, encajando perfectamente en el orificio en el que se encuentra situado un regulador de flujo, que hay que retirar previamente. Es necesario asegurarse de que las minibombas están completamente llenas de la solución deseada y de que no hay burbujas de aire en su interior. Se requiere un periodo de 4-6h para que la minibomba alcance un flujo de liberación constante.

Para implantar s.c. las minibombas, los animales fueron ligeramente anestesiados con éter. A continuación, se les hizo una pequeña incisión en la piel de la zona escapular, apartando el tejido conectivo subcutáneo, se hizo

un pequeño bolsillo donde se insertó la minibomba con el regulador de flujo al extremo opuesto de la incisión. Por último se cerró la incisión.

2.1.2. Determinación del grado de tolerancia y dependencia

Como índice de la tolerancia a la morfina, se evaluó el efecto analgésico producido por el opioide, a distintos tiempos tras la implantación de la suspensión oleosa o las minibombas en un grupo de animales paralelo a los grupos experimentales. Se utilizó el test del "tail-flick", tanto en el caso del ratón como en el de la rata, en el que se determina el tiempo que tarda cada animal en reaccionar al estímulo térmico. Se llevó siempre en paralelo un grupo de animales control a los que se les implantó únicamente placebo (suspensiones oleosas o minibombas sin morfina) y que sirvieron para determinar la latencia basal.

El test del "tail-flick" se realizó según la técnica descrita por Nott (1968). Consiste en la aplicación de un estímulo de tipo térmico en la cola del animal, para lo cual se introducen más de dos tercios de su cola en una cubeta con agua termostatzada a 52°C. La evaluación de la respuesta al dolor se realiza midiendo el tiempo (en segundos) que tarda el animal en reaccionar al estímulo doloroso con un enérgico coleteo o sacudida corporal. El tiempo de corte establecido fue de 10 segundos con el fin de no producir daño tisular al animal. Los resultados se expresan como la media ± E.S.M. del porcentaje del máximo efecto posible (%MEP).

$$\% \text{ MEP} = 100 * (\text{latencia del test} - \text{latencia basal}) / (10 - \text{latencia basal})$$

El grado de dependencia física a la morfina de los animales, se determinó valorando la aparición e intensidad del síndrome de abstinencia. La interrupción de la administración de un opioide en animales tolerantes da lugar a la expresión de la dependencia física, que se manifiesta con una serie de signos característicos que constituyen lo que se denomina "síndrome de abstinencia" (Blasig y col., 1973; Francis y Collier, 1975; Lérda y col., 1990). Para interrumpir la administración del opioide en los animales

pertenecientes a los grupos experimentales se procedió en el caso de la rata, a la retirada de las minibombas a las 72h de su implantación; en el caso del ratón no fue necesario este procedimiento porque está descrito que la suspensión de morfina se agota a las 72h de su implantación (Christie y col., 1984).

Para determinar el desarrollo de la dependencia física a la morfina se administró siempre a un grupo de animales tolerantes paralelo a los experimentales, el antagonista opioide naloxona, 5 mg/Kg en el ratón y 1 mg/Kg en la rata por vía intraperitoneal (i.p.), 3 días después de la implantación de la morfina y se procedió a evaluar la aparición de los signos característicos del síndrome de abstinencia. Estos signos comportamentales incluyen saltos, estiramientos, sacudidas, diarrea, ptosis, castañeteo de dientes y quejido al manejo. De entre estos signos, el más estudiado es la ejecución repetitiva de saltos (Lerida y col., 1989; Marquis y col., 1991) y es por tanto el que nosotros elegimos. Para cuantificar este parámetro, inmediatamente después de la administración de la naloxona, los animales se introdujeron en una caja de metacrilato de 28x28x40 cm de altura, y se registró el número de ellos que presentaron esta conducta. Como la mayor o menor incidencia de este signo se asocia con la intensidad del síndrome, también se cuantificó el número de saltos de cada animal. La conducta saltatoria se determinó durante los primeros 10 min, periodo en el que se producen más del 90% de los saltos que se pueden llegar a contabilizar en 30 min.

2.2. Obtención y caracterización de los antisueros empleados

A fin de elevar las posibilidades de reconocimiento de la secuencia antigénica cuando está integrada en una proteína madre se emplearon antisueros policlonales. En este trabajo se utilizaron, en los experimentos de actividad GTP-ásica, IgGs procedentes de antisueros policlonales que se purificaron por afinidad. Los antisueros se generaron frente a secuencias específicas de las subunidades α de las proteínas G y de los receptores opioides δ y μ . En la cuantificación de los péptidos β -endorfina 1-31 (β -end)

y N-Acetil- β -endorfina (1-31) (NAC), se empleó un antisuero policlonal generado frente a la secuencia completa de la β -endorfina humana (1-31) en el laboratorio del Prof. V. Höllt (Max Planck, Instituto de Bioquímica y Psiquiatría, Martinsried-Munich, Alemania), según la técnica descrita por Höllt y col (1978).

2.2.1. Técnicas de producción

La obtención de antisueros totalmente selectivos para los subtipos de G_a y para los receptores opioides es muy difícil. En este sentido, los tres subtipos de G_a presentan 87-93% de homología en sus aminoácidos; las G_oa presentan 72% de homología con las G_{ia} , un 30% con las G_{sa} y 40% con las G_{ta} , además de un 80% de homología entre ellas. La $G_{x/sa}$ exhibe una homología aproximada del 67% con los demás subtipos y en torno al 50% con las G_{ia} (Simon y col., 1991). En cuanto a los receptores, el receptor μ de la rata presenta una homología en la secuencia de un 66% con el receptor δ del ratón y de un 68% con el receptor K del ratón. Entre los receptores δ de la rata y el ratón la identidad en la secuencia alcanza el 97% (Reisine y Bell, 1993). Por otro lado, las diferencias entre las secuencias se encuentran muy dispersas en ellas, y en el caso de los receptores se localizan principalmente en los extremos amino y carboxilo terminales.

Las péptidos que se escogieron como antígenos tras realizar un análisis detallado de las secuencias fueron:

$\alpha_{x/s}$: C-TGPAESKGEITPELL, fragmento interno (111-125).

α_{12} : EEQGMLPEDLS, fragmento interno (115-125).

δ : C-MELVPSARAELOSSPL, extremo amino terminal (1-16) del receptor δ del ratón.

μ : Se eligieron dos secuencias distintas del receptor μ de la rata, una en el extremo amino terminal y otra interna. Fueron: MDSSTGPGNTSDCDP

(1-16), extremo N-terminal (al antisuero obtenido se le denominó MU/T); y CTKYRQGSID (208-216), fragmento interno (segundo bucle extracelular) probablemente implicado en la unión del agonista (al antisuero obtenido se le denominó MU/2EL).

Los números entre paréntesis se refieren a a los residuos de la secuencia deducida a partir del c-DNA y descritos en la bibliografía (Evans y col., 1992; Chen y col., 1993; Fukuda y col., 1993; Jones y Reed, 1987; Kieffer y col., 1992; Itoh y col., 1986; Matsouka y col., 1988; Matsouka y col., 1990; Strathmann y col., 1989; Thompson y col., 1993; Wang y col., 1993; Yasuda y Bell, 1993).

Acoplamiento de los péptidos a la proteína transportadora

Debido al bajo peso molecular de las secuencias seleccionadas y a fin de aumentar su actividad antigénica se conjugaron con una molécula transportadora de elevado peso molecular, la tiroglobulina bovina. Cuando hubo que orientar el péptido con respecto a la molécula transportadora, éste se sintetizó con una molécula adicional de cisteína en el extremo que iba a quedar anclado a la tiroglobulina y se utilizó como puente de unión entre el péptido y la molécula transportadora el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS). Cuando no fue necesaria la orientación, se utilizó el hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida para acoplar el péptido a la tiroglobulina (Harlow y Lane, 1988). Se utilizó MBS para conjugar los péptidos $\alpha_{1/2}$, MU/2EL y δ ; y la carbodiimida para los péptidos α_{12} y MU/T.

1. Acoplamiento de los péptidos mediante MBS

El MBS une péptidos a proteínas transportadoras a través de cisteínas y grupos amino libres. El procedimiento puede resumirse en los siguientes pasos:

-) Bloqueo de los grupos amino libres con anhídrido citracónico. Los péptidos y el anhídrido citracónico se disuelven en agua a una concentración

de 10 mg/ml, a continuación se mezclan al 50% (pH 8-9) y se incuban en agitación a temperatura ambiente durante 1h. Tras la incubación, se añade un 10% de fosfato sódico 1M (pH 7.2).

-) Adición del MBS (a una concentración de 25 mg/ml en dimetil formamida) a la solución del péptido hasta que se alcance una concentración de MBS de 5 mg/ml. Se incuba en agitación durante 1h a temperatura ambiente.

-) Separación del péptido del MBS no unido por filtración en gel en una columna G10 (Pharmacia) preequilibrada con fosfato sódico 100mM (pH 7.2).

-) Adición de la molécula transportadora (disuelta en tampón fosfato salino (PBS)) en una proporción de 1 mol de péptido/50 aminoácidos de transportador. La mezcla se incuba en agitación durante 3h a temperatura ambiente.

-) Diálisis con PBS 100mM para eliminar el péptido no unido.

2. Acoplamiento de los péptidos mediante carbodiimida

La carbodiimida une grupos carboxilo y grupos amino libres. El protocolo seguido para acoplar los péptidos a la tiroglobulina fue el siguiente:

-) Bloqueo de los grupos amino libres del péptido con anhídrido citracónico. En el caso de que el péptido antigénico sea rico en grupos carboxilos se pueden bloquear, como alternativa, los grupos amino de la proteína transportadora. Los péptidos y el anhídrido citracónico se disuelven en agua a una concentración de 10 mg/ml, a continuación se mezclan al 50% (pH 8-9) y se incuban en agitación a temperatura ambiente durante 1h.

-) Separación del péptido y del citracónico no unido por filtración en gel en una columna G10 equilibrada con agua.

-) Dilución del péptido con agua hasta alcanzar una concentración de 1mg/ml.

-) Adición de la carbodiimida a una concentración final de 10 mg/ml. Se ajusta el pH a 8 y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente.

-) Adición de un mismo volumen de la molécula transportadora

(disuelta en PBS) en una proporción de 1 mol de péptido/50 aminoácidos de transportador. La mezcla se incubó durante 4h a temperatura ambiente.

-) Adición de acetato sódico (pH 4.2) hasta alcanzar una concentración final de 100mM. De este modo se para la reacción. Se incubó durante 1h a temperatura ambiente.

-) Diálisis con acetato sódico (pH 4.2) durante 3h y después con PBS para separar el péptido no unido del conjugado péptido-proteína.

Inmunización de los animales

Antes de llevar a cabo la inmunización, el péptido se mezcla con un adyuvante para fomentar la respuesta inmunológica. El más utilizado es el adyuvante completo de Freund, que contiene bacterias inactivas suspendidas en una emulsión oleosa. Al mezclarlo con la solución acuosa del antígeno se forma una emulsión agua/aceite estable, que al inyectarse intradérmicamente a los conejos, forma un depósito del que el antígeno se va liberando lenta y continuamente. La composición del adyuvante completo de Freund es: marcol 52 85%, arlacel A 15% y bacterias secas de la especie Mycobacterium butyricum al 0.1%. El adyuvante incompleto de Freund carece de las bacterias (Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA, USA).

La inmunización se realizó según la forma descrita por Dunbar (1987) y el proceso que se siguió en este trabajo se detalla a continuación. Se hizo una mezcla (dilución 1:1) con el péptido (disuelto en solución salina a una concentración de 0.5-1 mg) y el adyuvante completo de Freund. Con la emulsión resultante se realizaron inyecciones intradérmicas, de 100 µl cada una, a ambos lados de la columna vertebral. Además se hizo una inyección subescapular, a unos 1.3 cm de profundidad, con 300 µl de la mezcla. En las inyecciones subsiguientes se utilizó el adyuvante incompleto de Freund.

A los cuarenta días de la primera inmunización se realizó una sangría de control en el conejo. Las sangrías se sucedieron (aproximadamente una cada mes) hasta que la titulación disminuyó. La sangre extraída se dejó a temperatura ambiente durante 3/4h transcurridas las cuales, se centrifugó

a 1000xg a 4°C (Sorvall RC5C, rotor SS-34). Se obtuvo un suero que se fraccionó y se liofilizó. La especificidad y reactividad cruzada de estos sueros se caracterizaron posteriormente por electroforesis seguida de inmunotransferencia.

Purificación de los antisueros

La purificación de los antisueros se realizó por cromatografía de afinidad sobre proteína A (cartuchos de cromatografía de proteína A: MemSep CAPA 100 01, Millipore), que es un ligando natural de las inmunoglobulinas. La proteína A es una proteína de la pared bacteriana de Staphylococcus aureus que se une a la región F_c de las inmunoglobulinas de mamífero, especialmente a las inmunoglobulinas G (IgGs).

El proceso de purificación fue monitorizado con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y consistió en los siguientes pasos:

-) Dilución de los sueros en un tampón formado por Tris-HCl 50mM, NaCl 0.2M a pH 7.7.
-) Filtración de la solución proteica.
-) Equilibrado del cartucho de proteína A con el tampón descrito anteriormente.
-) Inyección de la solución de proteína en el cartucho.
-) Aclarado del cartucho con el tampón hasta que la absorbancia alcance la línea de base.
-) Elución de la proteína absorbida al cartucho con glicina-HCl 0.2M a pH 2.5 hasta que la absorbancia recupera la línea de base. El material eluido se neutralizó con Tris-HCl 1M hasta alcanzar un pH de 7.5 y se concentró y dializó en PBS. Tras la diálisis el material resultante se fraccionó en alícuotas que se mantuvieron a -70°C hasta el momento de su utilización.

2.2.2. Métodos de caracterización

El radioinmunoensayo (RIA) es uno de los métodos más empleados en la cuantificación de antígenos (Ag) conocidos. Cuando es necesario identificar y caracterizar los Ag contenidos en una mezcla proteica compleja se utiliza la inmunotransferencia sobre membranas ("immunoblotting"). En este método las mezclas proteicas se resuelven en geles de separación analítica, y luego se transfieren a membranas para la identificación de los Ag individuales mediante antisueros específicos. Con el empleo de geles SDS/poliacrilamida se obtiene información acerca del tamaño y las relaciones moleculares de los Ag estudiados.

En este trabajo, la inmunotransferencia se utilizó para caracterizar los antisueros generados frente a secuencias específicas de las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{x,1}\alpha$ o de los receptores opioides μ y δ ; y el RIA se empleó para cuantificar los niveles de β -end y NAC en el SNC de la rata y el ratón, una vez se hubo caracterizado el antisuero generado frente a la secuencia completa de la β -end (Höhl y col., 1978).

Antisueros frente a las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{x,1}\alpha$ de las proteínas G y frente a los receptores opioides μ y δ

Electroforesis e inmunotransferencia

Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min en tampón de solubilización (Tris-HCl 50mM, SDS 5%, glicerol 10% y 2'-mercaptoetanol 5%, pH 6.8). Se utilizaron de 40 a 60 μ g de proteína para cada calle de la electroforesis, que se realizó en un gradiente de poliacrilamida (7-18% acrilamida/1.9% bis-acrilamida (peso/volumen)) (cubeta de electroforesis Hoefer SE 280); la corriente empleada fue de 15 mA (fuente de electroforesis ISCO 595). Como estándares se utilizaron fosforilasa b (músculo de conejo), catalasa (hígado bovino), alcohol deshidrogenasa (hígado de caballo) y anhidrasa carbónica (eritrocito bovino).

A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF (difluoruro de polivinilo) de 0.2 μ m (Biorad) durante 2h a 70 voltios (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Biorad). En este proceso se empleó tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.04% y metanol 20%, pH 8.3). Se procedió al bloqueo de los sitios de unión de proteínas desocupados con leche deslipidada ("Blotto", BioRad) en TTBS (Tris-HCl 50mM, NaCl 500mM, tween 20 0.05% a pH 7.7) durante 1h a 37°C. Tras lavar la membrana, se añadió el antisuero primario (dilución 1:3000) en TTBS. Este antisuero se incubó en agitación con la membrana durante toda la noche a 4°C (Deca Probe PR 150, Hoefer). Una vez retirado el primer antisuero, la membrana se lavó con TTBS. Como segundo antisuero se emplearon IgGs de cabra anti-conejo conjugadas con fosfatasa alcalina (dilución 1:3000) (Promega, #S373B) en TTBS, que se incubaron durante 2/3h a temperatura ambiente. Una vez retirado este segundo antisuero, la membrana se lavó con TTBS. Como sustrato para el revelado de la membrana se empleó una mezcla de NBT ("Nitroblue tetrazolium") y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) en dimetilformamida ("Western Blue", Promega, #S384B).

Los antisueros anti-G₁₂ α y anti-G₁₆ α inmunoreaccionan con proteínas de 39-41 kDa en estructuras neurales de SNC de ratón (Sánchez-Blázquez y col., 1993). El antisuero frente al receptor opioide δ detecta una proteína de 39 kDa en SNC de ratón (Garzón y col., 1994a) y dos proteínas, una de 39 kDa y otra de 43/45 kDa (probablemente se corresponda con una glicosilación del receptor), en las células NG 108-15 (Garzón y col., 1994b).

El antisuero frente al receptor opioide μ MU/T detecta en cerebro de ratón tres bandas proteicas, de 43 kDa, 51 kDa y 58 kDa, siendo la de 51 kDa la predominante. También detecta bandas correspondientes a pesos moleculares mayores, 100 kDa y 114 kDa, que podrían ser formas diméricas ya que desaparecen tras la sonicación de las muestras solubilizadas. Si las membranas se tratan con una enzima desglicosidante se obtiene una única banda de 43 kDa semejante a la descrita en la bibliografía (Cho y col., 1986; Lui-Chen y col., 1993; Eppler y col., 1993). De hecho, se han descrito cinco

sitios posibles de glicosilación en el extremo N-terminal del receptor μ en distintas especies (Lui-Chen y col., 1993). En membranas de células NG 108-15, en las que se han descrito sólo receptores δ , el antisuero MU/T detecta únicamente una tenue banda en torno a los 43 kDa (Garzón y col., 1995). Como las proteínas glicosiladas presentan alteraciones en su movilidad en SDS-PAGE, al utilizar el antisuero MU/2EL en las inmunotransferencias, la banda de mayor señal detectada en cerebro de ratón es la correspondiente a un peso molecular de 58 kDa (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1995), similar a la descrita por otros autores (Gioannini y col., 1993). Las inmunotransferencias que ilustran estos resultados se muestran en la **Figura 9**.

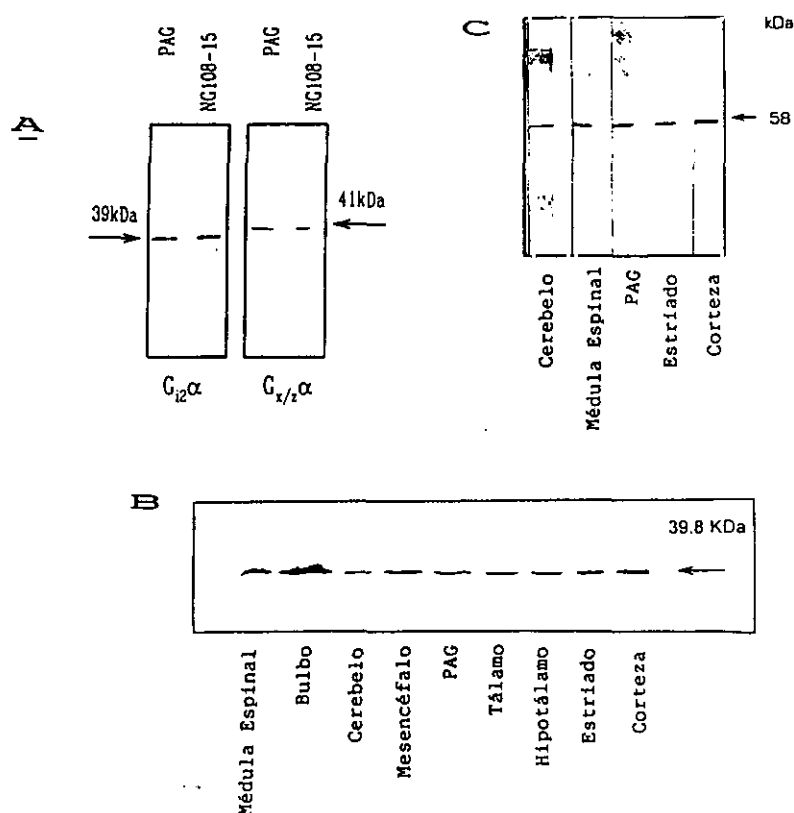


FIGURA 9. Inmunodetección de las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{x/2}\alpha$ (Panel A), del receptor δ (Panel B) y del receptor μ (Panel C) empleando antisueros específicos. Fracciones P_2 de cerebro de ratón o de células NG 108-15 fueron solubilizadas con SDS y 2' mercaptoetanol, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS. Después de transferir las proteínas a membranas de PVDF ('Western botting') se inmunodetectaron los antígenos con los correspondientes antisueros (dilución 1:3000).

Antisuero frente a la β -endorfina (1-31)

El antisuero (As) que se utilizó en este trabajo fue generado contra la secuencia completa de la β -endorfina humana (1-31). Previamente a la utilización de este antisuero en el radioinmunoanálisis, fue necesario realizar una serie de ensayos que nos informaran sobre sus características y que a continuación se detallan.

1. Titulación

Se llevó a cabo para conocer la dilución del As que era capaz de reconocer al 50% de una cantidad prefijada de su correspondiente Ag, en nuestro caso, β -end. Se prepararon diluciones crecientes del As, desde $1:10^4$ hasta $1:10^6$, que se incubaron durante 18-24h con 5000-10000 cpm de β -end marcada radiactivamente (^{125}I -Tyr²⁷- β -end) en el tampón RIA. A continuación, y para separar el complejo Ag-As del Ag libre, se añadió carbón activo, se centrifugaron los viales a 11000xg durante 10 min y se recogieron los sobrenadantes (contienen los complejos Ag-As) que se midieron en un contador LKB Wallac (1282 Compugamma CS). Se obtuvo la curva de la **Figura 10** en la que se representan: en ordenadas, el tanto por ciento de la formación del complejo As-Ag marcado (% As-Ag'), y en abcisas, las diluciones crecientes del As. El 50% de unión del antisuero a la β -end marcada se consiguió en torno a la dilución $1:10^5$, que fue la que se utilizó en los ensayos siguientes.

2. Sensibilidad

Se llevó a cabo para conocer la cantidad de Ag frío que es capaz de prevenir en un 50% la unión de la β -end marcada al As. Se utilizaron las siguientes concentraciones de β -end y NAC: 1, 3, 10, 30 y 100 fmoles/tubo, y se procedió según el protocolo del RIA que se detalla más adelante. Los resultados se representan en la **Figura 11**; a medida que aumenta la cantidad de Ag frío se observa una paulatina disminución de la unión complejo As-Ag'. 14 y 12 fmoles fueron las cantidades de β -end y NAC, respectivamente, que

redujeron la unión de la β -end marcada al As en un 50%.

3. Selectividad

Dado que existen muchos péptidos opioides endógenos cuya secuencia es semejante en algunos de sus aminoácidos con la de la β -end, principalmente en el extremo amino terminal (como es el caso del otro péptido que nos ocupa: NAC), es necesario estudiar la selectividad del As frente a dichos péptidos, ya que interferirían en la cuantificación del contenido de β -end en el RIA. Los péptidos empleados para evaluar la selectividad del As fueron:

β -Endorfina (1-31):

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-
Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-
Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-
Glu

³H-Acetil- β -Endorfina (1-31):

Ac-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-
Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-
Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-
Glu

β -Endorfina (1-27):

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-
Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-
Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr

β -Endorfina (6-31):

Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-
Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-
Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu

τ -Endorfina:

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-
Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu

Metionina-Encefalina:

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

Cada uno de ellos se empleó a las siguientes concentraciones: 1, 3, 10, 30 y 100 fmoles/tubo, y se procedió según la técnica general del RIA. En la **Figura 12**, se representan los resultados para cada uno de los péptidos ensayados. El As presentó una elevada selectividad tanto para β -end como para NAC; mientras que del resto de los péptidos se requerían concentraciones mucho mayores (hasta 3 logaritmos) para que comenzaran a ser reconocidos por el As. En este sentido, la bibliografía describe que la obtención de As altamente específicos frente las forma N-acetiladas de la β -end es difícil (Weber y col., 1982).

2.3. Determinación del contenido de β -endorfina (1-31) y N-acetil- β -endorfina (1-31) en estructuras del SNC e hipófisis de la rata y del ratón

El método más sensible de detección de péptidos es el radioinmunoensayo (RIA) que se puede considerar un ensayo de fijación en el que el receptor es un péptido activo. Esta técnica presenta como inconveniente la aparición de fenómenos de reactividad cruzada con péptidos relacionados y/o con precursores y metabolitos: el As sólo reconoce el determinante antigénico de la molécula del péptido contra la que fue generado, pero puede ocurrir que en la muestra existan otras moléculas que presentan el mismo determinante. Además, en esta técnica se emplean antisueros policlonales; los antisueros contienen una población de anticuerpos que reaccionan con partes distintas del Ag, su especificidad es, por tanto, la suma de las acciones de los diversos anticuerpos que integran su población. De hecho como se ha descrito en el apartado 2.2.2. de este capítulo, el As empleado en este trabajo reconocía las dos formas (1-31) del péptido β -end. Por tanto, se procedió a separar los péptidos de la muestra por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y a continuación, una vez aislados, se cuantificaron independientemente por RIA.

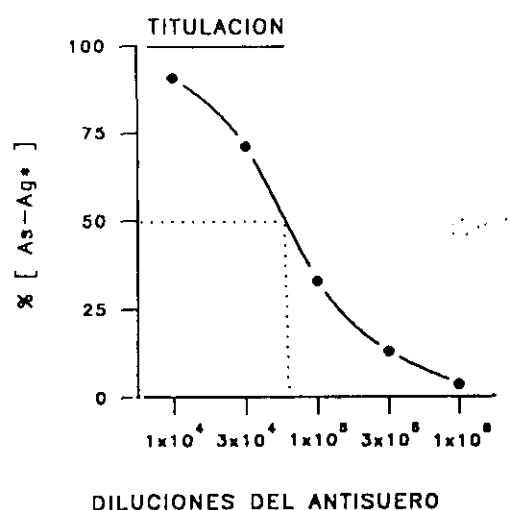


FIGURA 10. Titulación del antisuero frente a β -endorfina (1-31). Se representa en ordenadas, el tanto por ciento de formación del complejo antisuero-antígeno marcado y en abscisas, el rango de diluciones del antisuero empleadas.

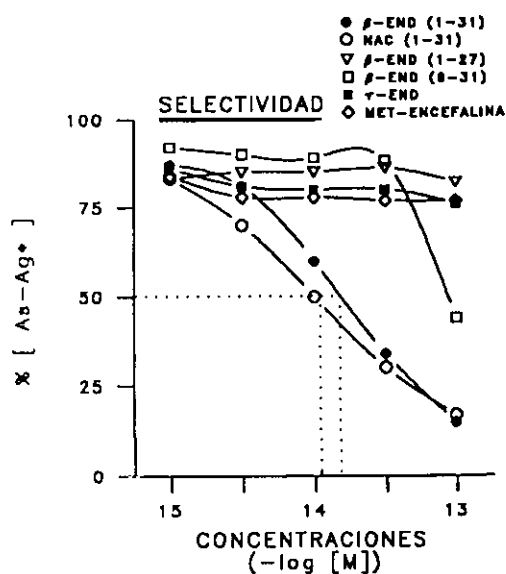


FIGURA 12. Selectividad del antisuero frente a β -endorfina (1-31). Se representa en ordenadas, el tanto por ciento de formación del complejo antisuero-antígeno marcado y en abscisas, las concentraciones molares de cada uno de los péptidos estudiados, expresadas en $(-)\log [M]$. La dilución de antisuero empleada de $1:10^5$.

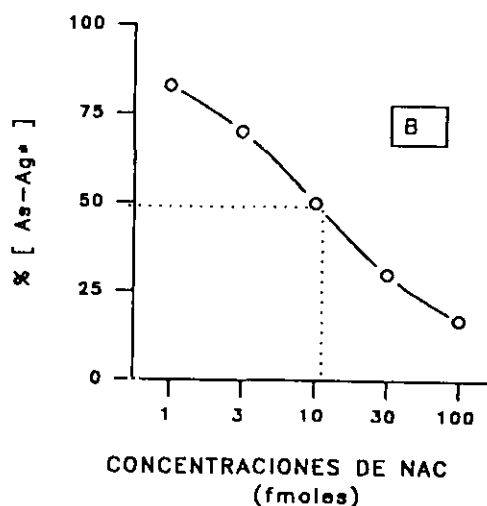
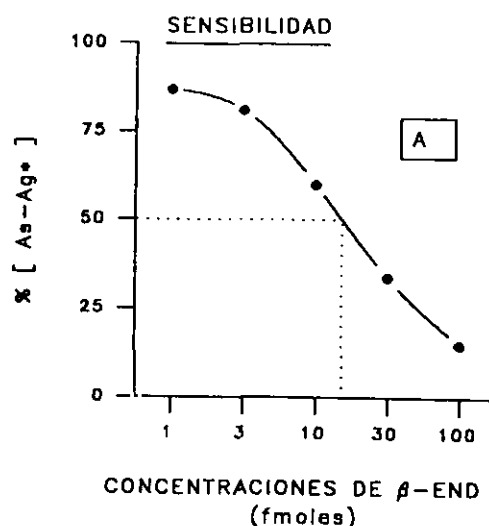


FIGURA 11. Curvas de sensibilidad del antisuero frente a β -endorfina (1-31). Se muestran los resultados para la β -endorfina (1-31) (β -end) en el panel A y, para la N-acetil- β -endorfina (1-31) (NAC) en el panel B. Se representa en ordenadas, el tanto por ciento de formación del complejo antisuero-antígeno marcado y en abscisas, las concentraciones crecientes de cada uno de los péptidos empleados (en femtomoles por tubo). La dilución de antisuero empleada fue de $1:10^5$.

2.3.1. Extracción de los péptidos. Preparación de las muestras

Se prepararon cuatro grupos experimentales: control, tolerante 24h, tolerante 72h (habían estado implantados con morfina durante 24h o 72h) y abstinentes (habían estado implantados con morfina durante 72h y se les sacrificó 24h después de la retirada de la minibomba o del agotamiento de la suspensión oleosa que contenían la morfina).

Los animales se sacrificaron por decapitación y rápidamente se obtuvieron y congelaron (sobre nieve carbónica a -70°C) las siguientes estructuras: septum, estriado, tálamo, hipotálamo, sustancia gris periacueductal (PAG), resto del mesencéfalo, bulbo-médula oblongata e hipófisis (separada como adenohipófisis y lóbulo neurointermedio en la rata). Una vez pesadas las estructuras, se resuspendieron en 5-10 volúmenes de ácido clorhídrico 0.1N, y se pusieron en un baño a ebullición durante 10 min, con el fin de inactivar las peptidasas endógenas. Con este procedimiento se minimiza la degradación de la β -end presente en las muestras por lo que se consigue recuperar mayor cantidad de péptido.

A continuación, las estructuras se homogeneizaron en frío, con un homogeneizador de teflón, para romper las células y facilitar la salida de los péptidos. Los homogeneizados se centrifugaron durante 10 min a 12000xg (Sorvall RC5C, rotor SS-34) y se recogieron los sobrenadantes que se fraccionaron y se liofilizaron. Los volúmenes de fraccionamiento fueron distintos para cada estructura, según su contenido endógeno, para adaptarlos así a la curva de calibrado del RIA. Los liofilizados se conservaron a -20°C hasta el momento de su fraccionamiento por HPLC.

2.3.2. Separación de β -endorfina (1-31) y de N-acetil- β -endorfina (1-31). Utilización de la cromatografía líquida de alta presión

HPLC con detección ultravioleta. Generalidades

La técnica de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa se basa en el uso de partículas de sílice de muy pequeño tamaño, revestidas de cadenas policarbonadas, que están firmemente empaquetadas en columnas de acero que soportan altas presiones. La interacción con este soporte permite que las moléculas de las distintas sustancias presentes en la muestra eluyan de la columna de diferente manera al pasar la fase líquida móvil, siendo posible la separación de sustancias que difieren sólo ligeramente en las propiedades de interacción con el soporte.

La cromatografía de fase reversa es el método de separación más utilizado en la separación de péptidos. Los péptidos de diferente polaridad eluyen secuencialmente, en función de su hidrofobicidad, con gradientes de fase móvil o incrementando la concentración de solvente orgánico. En este tipo de cromatografía, se produce una atracción primaria entre la fase estacionaria, apolar, y la región no polar del soluto. El orden de elución es, por tanto, de hidrofílico a hidrofóbico (de polar a no polar). Variaciones de pH o de concentración y tipo de sales en la fase móvil, cambian la polaridad de los péptidos y, por tanto, su retención en columnas de fase reversa. La fase estacionaria más común son columnas policarbonadas C_{18} que son lo suficientemente hidrofóbicas como para retener péptidos pequeños pero que también retienen los grandes. La elución en gradiente se emplea para reducir el tiempo de análisis aumentando la fuerza del solvente con el tiempo. Se utiliza para separar mezclas complejas, con varios componentes de polaridad diferente. Los gradientes pueden ser binarios, ternarios o cuaternarios según el número de solventes empleados en la separación; pueden ser lineales o no, según la curva que los defina; también se pueden emplear gradientes de flujo o incluso, combinar los dos. Con el fin de no dañar la columna, la muestra a cromatografiar debe estar libre de partículas en suspensión y su pH dentro de los límites de estabilidad del soporte, siendo además aconsejable

la utilización de una precolumna que proteja el buen funcionamiento de la columna.

Los métodos de detección de las sustancias cromatografiadas se basan en las propiedades físico-químicas de las moléculas. La detección ultravioleta se emplea en la detección de compuestos aromáticos (absorben a 280 nm), ácidos y amidas (absorben a 210 nm) y péptidos (absorben a 214 nm). En general, se consigue una detección muy sensible de la mayoría de los péptidos, a una longitud de onda entre 200 y 220 nm. Sin embargo, los péptidos que presentan aminoácidos aromáticos, pueden detectarse a 280 nm, con este método se pierde sensibilidad pero se eliminan los problemas de absorción de la fase móvil.

Preparación de las muestras

Los liofilizados se resuspendieron en 100 µl de agua destilada y se ultracentrifugaron a 100000xg (Beckman TL 100, rotor TL 100-1) durante 30 min, con el fin de eliminar cualquier posible partícula en suspensión. Los sobrenadantes obtenidos se inyectaron en el sistema cromatográfico el mismo día de su generación.

Condiciones cromatográficas

La separación de los péptidos β -end y NAC se llevó a cabo por HPLC, con detección ultravioleta, empleando columnas cromatográficas de fase reversa. El sistema cromatográfico que se utilizó constaba de dos bombas de alta presión (Perkin-Elmer, series 10 "liquid chromatograph"), controlador de gradiente (Perkin-Elmer, series 20 "LC controller"), precolumna (Spherisorb 10 ODS-2, 500x4.6 mm, tamaño de partícula 10 µm), columna de fase reversa (Spherisorb 5 ODS-2, 250x4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm), detector ultravioleta (Perkin-Elmer, LC-75 "spectrophotometric detector"), y un integrador (Perkin-Elmer, "chromatographic intelligent-terminal").

La separación cromatográfica se realizó con un gradiente lineal de 20 min y se utilizó como fase móvil tampón ácido acético 0.1M ajustado a pH 5.0 con trietilamina (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). Las condiciones iniciales fueron A:B= 65:32 y las finales A:B= 62:37. Previamente a su utilización, la fase móvil se desgasificó, con el fin de evitar el efecto desestabilizador de las burbujas de aire sobre la presión de las bombas cromatográficas y la presión del detector.

Los tiempos de retención de los dos péptidos se determinaron con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm tras la inyección de cantidades conocidas (5-10 µg) de los péptidos sintéticos β-end y NAC. El flujo empleado fue de 1.5 ml/min. Bajo estas condiciones cromatográficas, los tiempos de retención fueron: 9 min para β-end y 14 min para NAC. Dichos tiempos de retención se confirmaron varias veces a lo largo de la jornada de trabajo para verificar que no sufrían alteraciones. En la **Figura 13** se presentan varios cromatogramas que muestran la separación de los dos péptidos. La cantidad de muestra inyectada fue de 80-100 µl. En cada una de ellas, se recogieron las fracciones correspondientes a los dos péptidos que se liofilizaron para eliminar los solventes que interfieren en el RIA. Para calcular el porcentaje de recuperación de cada péptido, en diversos momentos del proceso de preparación de las muestras (durante la extracción de los péptidos y antes de la inyección en el sistema cromatográfico) se añadieron cantidades conocidas de β-end y NAC a una estructura que nos sirvió de control negativo: el cerebello.

2.3.3. Radioinmunoensayo. Metodología general

El radioinmunoensayo (RIA) es un método de cuantificación de moléculas biológicas con capacidad antigénica o susceptibles de adquirirla por conjugación a otras más voluminosas. El método se basa en una reacción antígeno-antisuero (Ag-As), en la que el antisuero (As) se une a su antígeno (Ag) específico. Como la unión Ag-As tiene lugar a través del establecimiento de puentes no covalentes, la reacción Ag-As es reversible y sigue, por tanto, la ley de acción de masas. Sin embargo, antisueros de elevada afinidad

tienden a estabilizar el complejo Ag-As haciendo muy difícil su disociación. El Ag se encuentra de dos formas: marcado radiactivamente (Ag caliente) y sin marcar (Ag frío); los dos compiten por unirse al As, de manera que se forman dos tipos de complejos: complejo marcado y complejo sin marcar. Una vez alcanzado el equilibrio, en nuestro caso una vez transcurridas 18-24h de incubación, los complejos formados se separan del Ag libre por absorción de éste al carbono activo, que se elimina después por centrifugación.

Como en el ensayo la concentración de As y Ag son constantes, la cantidad de complejo marcado es el índice del contenido de Ag frío existente en la muestra problema. Por tanto, cuanto mayor cantidad de Ag contenga la muestra, menos cantidad de complejo marcado se formará en el equilibrio. Esta cantidad se determina por conteo radiométrico de una alícuota del sobrenadante que resulta al separar por centrifugación el carbono activo unido al Ag no acoplado al As. En todos los ensayos de RIA se procesa en paralelo una curva de calibración, en la que la muestra problema se sustituye por cantidades conocidas de Ag frío, que nos permite conocer la cantidad de éste presente en el material biológico en estudio.

Este RIA se utilizó para determinar el contenido de β -end y de su derivado acetilado en las estructuras de rata y ratón ya mencionadas, obtenidas y procesadas según se indicó en apartados anteriores. Se empleó como trazador marcado $^{125}\text{I-Tyr}^{27}$ - β -endorfina y se siguió el procedimiento descrito por Höllt y col (1979). Una vez reconstituídas las muestras problema en los volúmenes adecuados de tampón de RIA, se incubó la siguiente mezcla de reacción durante 18-24h a 4°C:

- 300 μl de tampón RIA de incubación,
- 50 μl de muestra problema o del Ag frío en el caso de la curva de calibración,
- 50 μl de β -end marcada radiactivamente y,
- 100 μl del As en la dilución que se unía al 50% con la β -end marcada (dilución final 1:10⁵);

de modo que el volumen final de reacción fue de 500 μl .

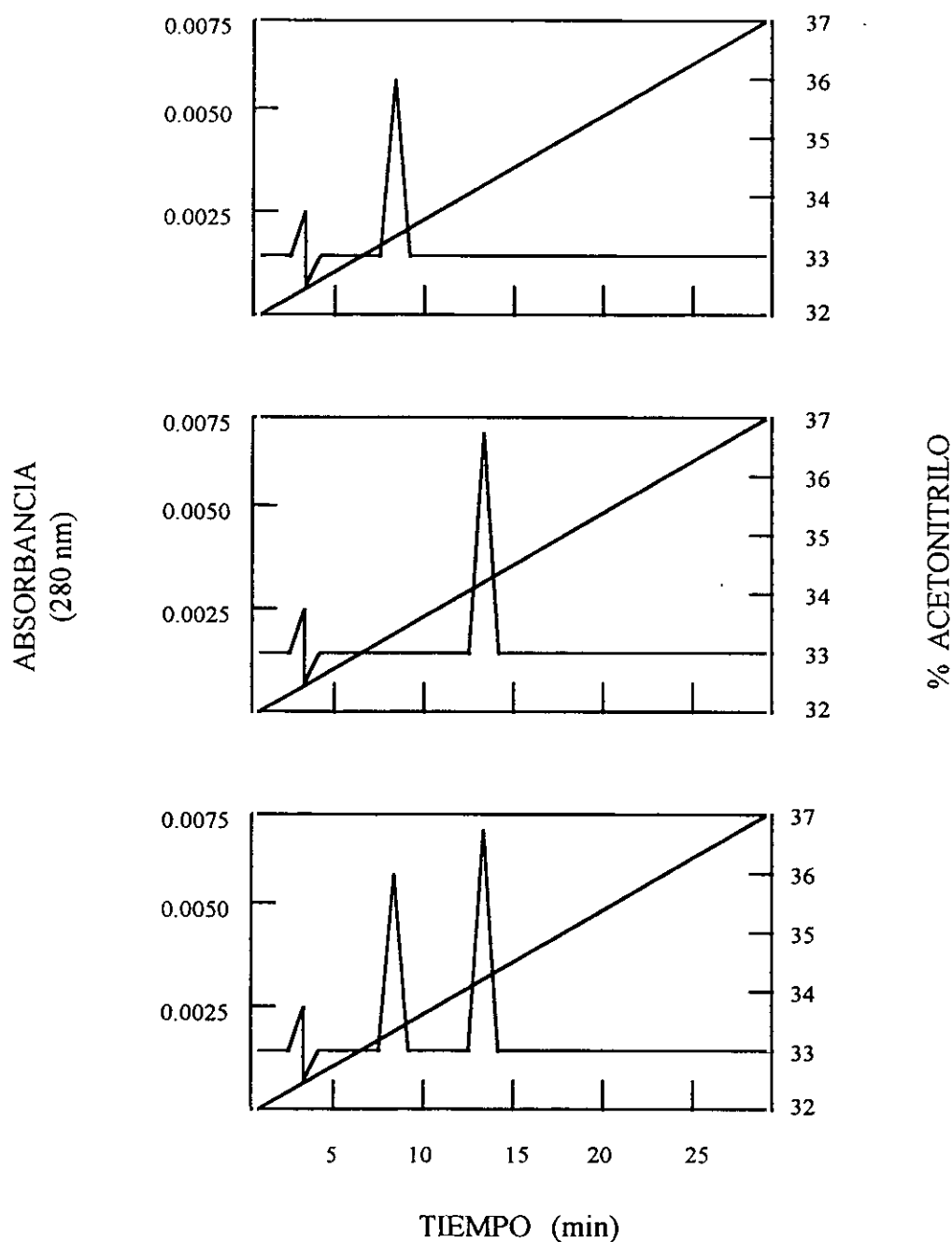


FIGURA 13. Cromatogramas de HPLC de fase reversa en el que se muestran los tiempos de elución de 5 μg de β -endorfina (1-31) (A), de 10 μg de N-Acetil- β -endorfina (1-31) (B) y de ambos péptidos (C) determinados por absorbancia a 280nm. En ordenadas se representa, a la izquierda, las unidades de absorbancia y, a la derecha, el porcentaje de acetonitrilo. En abcisas se representa el tiempo (en minutos). También aparece trazado el gradiente lineal de acetonitrilo empleado para la separación.

El tampón RIA de incubación está formado por: tampón fosfato sódico 0.02M (pH 7.5), NaCl 0.15M, BSA 0.01%, gelatina 0.1%, tritón-X-100 0.1% (Panreac) y timerosal 0.01%. Cada muestra problema o punto de la curva de calibrado se realizó por duplicado.

La curva estandar se construyó con las siguientes cantidades de β -end fría: 1, 3, 30 y 100 fmoles/tubo. La curva se completó con unos tubos de:

- cuentas totales, llevaban únicamente β -end marcada y el tampón de incubación. Se procesaron con agua destilada en vez de con carbón activo y nos indicaban la radiactividad total presente en el ensayo,

- blancos, llevaban una cantidad muy alta de β -end fría, aproximadamente de 1nmol/tubo, de este modo la β -end marcada queda desplazada completamente. Se procesaron con carbón activo y nos indicaban la radiactividad residual del ensayo y,

- ceros, no llevaban β -end fría y se procesaron con carbón activo. Nos permitían conocer el % de unión del Ac al Ag.

Transcurrido el tiempo de incubación, 18-24h a 4°C, se añadió a todos los tubos 500 μ l de tampón de revelado. En los tubos que anteriormente denominamos cuentas totales, el tampón de revelado se sustituyó por el mismo volumen de agua destilada. El tampón de revelado es idéntico al tampón RIA pero carece de tritón-X-100 y está suplementado con carbón activo 1.5% (Norit A, Serva) y BSA 0.75%. A continuación, los tubos se agitaron y se centrifugaron a 11000xg durante 10 min. Se recogió una alícuota de cada sobrenadante y se procedió a su contaje radiométrico.

2.4. Determinación de la actividad GTP-ásica en el SNC del ratón y en las células híbridas NG 108-15

La determinación de una actividad nucleótido trifosfatasa (NTPasa) específica para el GTP en un sistema multifuncional como la membrana plasmática requiere un ensayo en el que se hayan suprimido al máximo las actividades nucleótido trifosfatasas no específicas. Por ello, se utiliza una concentración baja de GTP (30nM-3µM) y un inhibidor de gran número de ATPasas, el análogo no metabolizable del ATP AppNHp.

La membranas contienen actividades nucleósido quinasa y adenilato quinasa que, en presencia de ADP, redistribuyen la radiactividad tanto a nucleótidos de adenina como de guanina. Para evitarlo, se introduce en el ensayo un sistema regenerador de ATP formado por la fosfato de creatina y la creatina fosfoquinasa. La adición de ATP mejora el rendimiento del sistema regenerador de ATP (Cassel y Selinger, 1976). Al inhibir la ATPasa de Na⁺/K⁺ empleando ouabaina también se evita la hidrólisis no específica de GTP por ATPasas. En el ensayo también se incluyen MgCl₂ y NaCl, el primero es necesario para que se produzca la disociación de la subunidad α del complejo βγ, y el NaCl para disminuir la interacción de los receptores desocupados con las proteínas G (Carty y col., 1990, Koski y col., 1982, Costa y col., 1990). De hecho, es bastante probable que la actividad GTPásica basal se deba a esa interacción. En ausencia del ión sodio, la actividad basal es tan grande que impide estudiar la estimulación de la enzima por agonistas.

2.4.1 Preparación de los sinaptosomas

Los ratones se sacrificaron por decapitación y el cerebro y la médula espinal se extrajeron rápidamente. El cerebro se diseccionó en diferentes estructuras sobre una placa de Petri a 4°C. Estas estructuras fueron: corteza cerebral, estriado, tálamo, hipotálamo, sustancia gris periacueductal (PAG), resto del mesencéfalo y bulbo-médula oblongata. En los experimentos realizados para caracterizar la actividad GTPásica del SNC de ratón se

utilizaron sinaptosomas de cerebro total.

El tejido procedente de al menos 5 animales se reunió, se lavó en tampón Tris/HCl 25mM, EGTA 1mM (pH 7.4) a 4°C y se homogeneizó en frío con un homogeneizador Polytron PT-10-35. En algunas ocasiones éste tampón fue suplementado con sacarosa 0.32M. El precipitado generado (correspondiente a la fracción nuclear) tras una centrifugación de 10 min a 1000xg (Sorvall RC5C, rotor SS-34) se resuspendió en el mismo volumen de tampón y se desechó tras otra centrifugación a 1000xg. A continuación, los dos sobrenadantes resultantes se reunieron y se centrifugaron a 22500xg durante 20 min. El precipitado así obtenido, se resuspendió de nuevo en el tampón y se sometió a otra centrifugación adicional a 22500xg durante 20 min. El nuevo precipitado, correspondiente a la fracción P₂ rica en sinaptosomas, se conservó y el sobrenadante se ultracentrifugó a 200000xg (Beckman L8-80M, rotor 70 Ti) durante 1h. Este último precipitado se denominó P₃.

Según el tampón en el que hubieran sido preparados los precipitados se denominaron: P₂sin, P₂con, P₃sin o P₃con. Con esta denominación se hace referencia a la presencia (con) o no (sin) de sacarosa durante el proceso de generación de los precipitados. En todos los experimentos, excepto en aquellos realizados para caracterizar la actividad GTPásica del SNC de ratón se utilizaron fracciones P₂. La razón fue la siguiente: aunque en las fracciones P₃ se detecta actividad GTPásica de baja Km, ésta no se modifica ni por agonistas ni por antagonistas (Ott y col., 1989). Los precipitados se resuspendieron en Tris/HCl 25mM, EGTA 1mM (pH 7.4) a una concentración media de proteína 3-7 µg/µl y se congelaron en fracciones a -70°C hasta que se utilizaron.

2.4.2. Preparación de membranas a partir de células híbridas NG 108-15 en cultivo

Las células, en PBS, se desprendieron de los frascos por agitación y se precipitaron por centrifugación a 500xg (Beckman GP) durante 5 min. Las células se resuspendieron en tampón Tris/HCl 25mM, EGTA 1mM, sacarosa

0.32M (pH 7.4) a 4°C, hasta alcanzar una concentración de 10^6 células/ml, y se homogeneizó en frío con un homogeneizador teflón/vidrio. La fracción P_2 con se preparó como en el caso de los sinaptosomas.

2.4.3. Descripción del método

La determinación de la actividad GTPásica asociada a proteínas G se llevó a cabo monitorizando la liberación de ^{32}Pi a partir de $[\tau\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$. El ensayo para determinar la actividad GTPásica es una modificación del método de Cassel y Selinger (1976). El medio de incubación consiste en: GTP 3 μM , $[\tau\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 0.4nM (4×10^5 c.p.m.), EDTA 0.1mM, ditiotreitol 2mM, NaCl 100mM, MgCl_2 5mM, App(NH)p 0.25 mM, ouabaina 1mM, ATP 1mM, fosfato de creatina 10mM, 2.5 unidades de creatina fosfoquinasa, Tris-HCl 10mM (pH 7.4) y 1–5 μg de fracción proteica, todo ello en un volumen final de 100 μl . A fin de proteger los péptidos endógenos (como la β -end o su derivado acetilado) de la degradación de proteasas inespecíficas se incluyeron en la mezcla de incubación BSA 0.1% y bacitracina 0.01%. En ensayos de fijación estos agentes habían demostrado ser eficaces en la protección de estos péptidos (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1991).

En general, la reacción se inició con la adición de la suspensión de membranas al medio de incubación precalentado y se llevó a cabo durante 10/20 min a 37°C. Sin embargo, como se describirá en el próximo apartado, el protocolo experimental sufrió variaciones en función del estudio que se estuviera abordando. Tras la incubación, las muestras se enfriaron en un baño de hielo (en esas condiciones la hidrólisis de $[\tau\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ es inapreciable). A continuación, para inhibir por completo la actividad enzimática y para separar el ^{32}Pi del $[\tau\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ no hidrolizado, se añadieron 900 μl de una suspensión de carbón activo al 5% (peso/volumen) (Norit A, Serva) en ácido fosfórico 20mM (pH 2.3) a 4°C. Después de realizar una centrifugación a 11000xg durante 15 min se recogieron 500 μl del sobrenadante (donde se encuentra el ^{32}Pi) a los que se añadieron 2 ml de líquido de centelleo (ECOLUME, ICN). Por último se procedió a su contaje radiométrico en un contador de centelleo (Beckman, LS-5801).

En estas condiciones experimentales, la hidrólisis de GTP fue de aproximadamente un 20%. La hidrólisis dependiente del componente enzimático de alta afinidad constituye el 30-50% de la hidrólisis total. La liberación de ^{32}P i por este componente se reduce por competición al incrementar la concentración de sustrato no marcado (GTP). En presencia de un exceso de GTP frío el ^{32}P i liberado se debe esencialmente a la actividad de NTPasas de baja afinidad. Esta hidrólisis de baja afinidad no está mediada por proteínas G y se incrementa en relación directa al aumento de la concentración de GTP. Los blancos (sin proteína) presentaron una radioactividad residual del 1-2%.

La actividad GTPásica de baja K_m (de alta afinidad) se obtuvo sustrayendo la observada en presencia de una concentración alta de GTP (1 mM) de la hidrólisis total observada (en c.p.m.) a una concentración baja de GTP (30 nM o 3-30 μM , dependiendo del experimento). Este cálculo permite eliminar el componente hidrolítico debido a las nucleósido trifosfatasas inespecíficas. A lo largo de este trabajo se aludirá al componente específico como actividad GTPásica de alta afinidad o de baja K_m , indistintamente.

Los resultados se expresan según el ensayo, en pmoles de GTP hidrolizados/mg de proteína/minuto, como % [γ - ^{32}P]GTP hidrolizado, o como % actividad basal. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El análisis de los datos para calcular la constante de afinidad (K_m) y la velocidad máxima de la reacción (V_{max}) se llevó a cabo mediante la representación de Lineweaver-Burk en la que se relaciona la inversa de la velocidad de la reacción [(1/pmol).mg.min] en ordenadas con la inversa de la concentración de sustrato (1/GTP) en abcisas. Las concentraciones de GTP empleadas fueron 0.07, 0.08, 0.1, 0.16, 0.25, 1, 10 y 100 μM . Los datos se ajustaron a una recta en la que la K_m viene dada por la inversa cambiada de signo de la intersección de la recta con el eje de abcisas, y la V_{max} se determina como la inversa de la intersección de la recta con el eje de ordenadas. Del mismo modo, la pendiente de la recta se corresponde con la relación K_m/V_{max} . Los resultados se expresan en (1/pmoles hidrolizados).mg proteína.minuto para la 1/V y en μM de GTP para la K_m . Los datos se estudiaron, por tanto, por análisis de regresión lineal y las

constantes cinéticas se obtuvieron empleando la ecuación de Michaelis-Menten (Tallarida y Murray, 1981).

2.4.4. Protocolos experimentales empleados

Protocolo inicial

En la caracterización de la actividad GTPásica del SNC de ratón y en el estudio comparativo en estructuras del SNC de ratones controles y tolerantes se añadió la suspensión de membranas al medio de incubación precalentado a 37°C y la mezcla se dejó en incubación a esa temperatura durante 10 min (Cassel y Selinger, 1976; Koski y col., 1982; Ott y col., 1989; Selley y Bidlack, 1992). La actividad GTPásica de baja afinidad se determinó en presencia de GTP 1 mM. La actividad total se obtuvo en presencia de 30 nM de sustrato.

Protocolo de preincubación en frío

En las condiciones experimentales descritas se ensayaron los efectos de los agonistas opioides morfina, DAGO y DADLE sobre la actividad GTPásica de baja K_m en el PAG de ratón. Para conseguir efectos estimulatorios en torno al 25% sobre la actividad GTPásica basal (55-60 pmoles/mg/min), por otra parte bastante limitados, se necesitaron concentraciones micromolares de los agonistas a fin de producir una alta ocupación del receptor opioide. El péptido endógeno β -end se presentó incluso más débil en este efecto (únicamente un 10% de incremento con respecto a los valores basales). Las concentraciones de los opioides empleadas así como los efectos que éstas provocaron coinciden con las descritas en la bibliografía (Barchfeld y Medzihradsky, 1984; Clark y col., 1986; Fedynyshyn y Lee, 1989; Franklin y Hoss, 1984).

Se intentó mejorar el rendimiento de la reacción aumentando el tiempo de incubación a 37°C. Dado que estas enzimas son termosensibles, la hidrólisis de GTP cesa prácticamente luego de 20-25 min de incubación. En

esas condiciones experimentales la respuesta de las membranas a una concentración micromolar de DADLE (10 μ M) mejoró con respecto a la obtenida en el protocolo anterior (alrededor del 40% sobre la actividad basal) pero únicamente cuando las concentraciones de sustrato presentes en el ensayo eran muy altas (3-10 μ M de GTP) (ver apartado 3.3. de resultados).

Con objeto de obtener activación de la actividad GTPásica de alta afinidad a concentraciones selectivas de los diferentes subtipos del receptor opioide, en el rango nanomolar, se exploró el resultado de equilibrar los agonistas con el tejido antes de iniciar la reacción enzimática. Para evitar el deterioro enzimático que se produce con la temperatura se realizaron incubaciones en frío (a 4°C) a distintos tiempos, desde 1h hasta 3h. A partir de 2h de preincubación concentraciones en el rango nanomolar, modificaron la respuesta de la actividad GTPásica del PAG de ratón, por lo que ese fue el periodo seleccionado en nuestros experimentos. En este sentido, un trabajo previo de nuestro grupo ha demostrado que a los 90 min de incubación a 4°C se alcanza el equilibrio de unión de los opioides con el receptor μ del SNC del ratón (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1987). A esa temperatura la enzima no se deteriora y el ligando (a concentraciones nanomolares) tiene tiempo de equilibrarse con sus receptores más específicos por lo que ahora es posible que esas concentraciones induzcan la estimulación de la actividad GTPásica.

Por tanto, en los experimentos en los que se ensayó el efecto de una sustancia (agonista, antagonista o mastoparén) sobre la actividad GTPásica de alta afinidad, se realizó una preincubación con las membranas en Tris-HCl 10mM, EGTA 0.5mM (pH 7.4) durante 2h a 4°C con el objeto de equilibrar estas sustancias con sus receptores o proteínas diana. A continuación esta suspensión de membranas (20 μ l) se llevó al medio de incubación (80 μ l) previamente precalentado a 37°C y que contenía todos los componentes necesarios para la reacción a excepción lógicamente de la sustancia a ensayar y las membranas. La concentración de proteínas y sustancias en la suspensión era la apropiada para obtener la concentración final deseada en la incubación (100 μ l). La reacción se realizó durante 20 min a 37°C.

Protocolos de trabajo con antisueros

1. Tratamientos "in vitro"

En la mayoría de los experimentos, se siguió el protocolo descrito en la literatura. Este método consta de dos pasos: i) una preincubación del medio de incubación junto con las membranas, los antisueros y el GTP, en un volumen final de 80µl durante 1h a 37°C; y ii) una incubación de 20 min a 37°C de la mezcla anterior a la que se le añaden el [γ -³²P]GTP y la sustancia a estudiar (en un volumen de 20µl); el volumen final de la reacción es de 100µl (McClue y col., 1992; McKenzie y col., 1988; McKenzie y Milligan, 1990). A este protocolo pasamos a denominarlo Protocolo 1.

Este protocolo hubo de ser modificado, concretamente al estudiar la contribución de la subunidad $G_{i/o}\alpha$ del PAG a la actividad GTPásica sensible a opioides. Se comenzó incubando las membranas con el antisuero en una concentración salina y en presencia de BSA, durante 3h a temperatura ambiente. En esas condiciones los agonistas opioides produjeron una pobre estimulación GTPásica y, por tanto, la posible inhibición del proceso por el antisuero no pudo determinarse. Subsecuentemente, se sustituyó el primer paso del protocolo que denominamos protocolo 1 (1h a 37°C) por una preincubación en frío (4°C) a distintos tiempos, desde 2h hasta 12h. Sin embargo, no se observó regulación de la actividad enzimática por los agonistas opioides y obviamente fue imposible determinar su modulación. Se puede concluir, por tanto, que una preincubación de las proteínas en presencia de GTP a baja temperatura no favorece ni el proceso de estimulación por los agonistas ni el acceso de los antisueros a las subunidades α de las proteínas G.

En presencia de una concentración alta de GTP (en el rango micromolar) aunque la actividad GTPásica es prácticamente inexistente, sin embargo es posible que los receptores opioides se desacoplen de las proteínas G y pasen a un estado de baja afinidad para el agonista lo que resulta en una pobre unión del ligando por su receptor. En presencia de GTP y a 37°C, las

proteínas G se disocian, aumenta la actividad GTPásica, y el antisuero tiene más posibilidades de reconocer las subunidades $G\alpha$. Como no todas las proteínas G presentan la misma afinidad (Km) por el GTP, aquellas que requieran mayor cantidad de GTP, como la $G_{x,\alpha}$ (Casey y col., 1990), no podrán manifestarse si se emplea el protocolo 1, a menos que se empleen concentraciones más altas del nucleótido. Hay que considerar que la concentración de GTP disminuirá rápidamente a 37°C al carecer la mezcla de incubación del sistema regenerador de GTP. Por ello, en experimentos dirigidos a estudiar la modulación de la actividad GTPásica de la subunidad $G_{x,\alpha}$, se utilizó un protocolo muy parecido al 1, pero en el primer paso se sustituyó el GTP por la sustancia a estudiar lo que facilita una elevada ocupación del receptor por el agonista en el ensayo. El GTP, por tanto, acompaña a las proteínas sólo en la última parte del experimento, durante la incubación de 20 min a 37°C y su concentración durante el ensayo de actividad GTPásica será suficiente como para que todas las subunidades α de las proteínas G puedan manifestarse. A este protocolo le denominamos Protocolo 2.

2. Tratamientos "in vivo"

Se emplearon ratones ligeramente anestesiados con éter a los que se administró por vía intracerebroventricular 4 μ l de antisueros purificados anti- $G_{12,\alpha}$ y anti- $G_{x,\alpha}$ a una dilución equivalente de 1:1000. Los animales fueron sacrificados a las 24h de la inyección, se aislaron los PAG y se prepararon las fracciones P_2 que se utilizaron para la determinación de la actividad GTPásica. El protocolo que se siguió para ello fue el de preincubación en frío, seguido de una incubación de 20 min a 37°C. El componente de baja afinidad (definido en presencia de GTP 1 mM) se sustrajo de la hidrólisis detectada con una concentración de GTP de 3 μ M.

2.5. Determinación de proteínas

Se siguió una modificación del método original Folin-Phenol descrito por Lowry y col (1951). Dicho método se basa en la formación de un complejo

cobre-proteína en un medio alcalino que reduce al reactivo fosfomolibdico-fosfotungsténico (reactivo de Folin) formando un compuesto coloreado que se mide fotométricamente.

Para la realización de este ensayo, se necesita una curva patrón de proteína (desde 5 hasta 100 µg de proteína/tubo) que se prepara a partir de una solución de BSA de concentración 0.5 mg/ml. Se toma un volumen de 1 ml del homogeneizado problema y de las soluciones conocidas de BSA, se les añade 100 µl de desoxicolato sódico 0.15% (para favorecer la extracción de las proteínas), se esperan 10 min y luego se añaden 100 µl de ácido tricloroacético 72 % (para precipitar las proteínas). A continuación se centrifugan las muestras a 11000xg durante 10 min al cabo de los cuales se elimina el sobrenadante. A continuación, se resuspenden los precipitados en 200 µl de NaOH 0.8N, 200 µl de CTC (un reactivo compuesto por tartrato sódico 0.2%, sulfato cúprico 0.1% y carbonato sódico 10%) y 400 µl de SDS 5%. Se agitan y se esperan 10 min. Luego se añaden 400 µl de reactivo de Folin 0.5 N y se mide la absorción de cada muestra a 750 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB, Novaspec II) una vez transcurridos 45 min. Con los datos obtenidos se construye una curva de calibrado sobre la que se determina la cantidad de proteína contenida en las muestras problema.

Esta modificación del método de Lowry descrita por Peterson (1983), permite una valoración de proteínas (solubles y de membrana) muy fiable, incluso en soluciones muy diluidas. Con la precipitación se consigue además, concentrar la proteína y eliminar la mayoría de sustancias que interfieren en la formación del complejo coloreado.

2.6. Análisis estadístico

Las diferencias significativas se determinaron por análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue $p < 0.05$. Se empleó el programa estadístico "Pharmacologic Calculation System" (Tallarida y Murray, 1981).

RESULTADOS

1. Evolución temporal de la tolerancia y dependencia a la administración crónica de morfina

La administración crónica de morfina se realizó, según se detalla en el apartado 2.1.1. de Materiales y Métodos, mediante la administración subcutánea de una suspensión de morfina en el ratón y, por la implantación subcutánea de minibombas osmóticas conteniendo una solución de morfina en la rata.

El desarrollo de la tolerancia se siguió a distintos tiempos tras la implantación de la morfina a través de los cambios sufridos en la actividad analgésica del opioide en el test del "tail-flick" con estímulo térmico nociceptivo. Los resultados están representados en la **Figura 14**. La actividad antinociceptiva se expresa como la media±E.S.M. del porcentaje del máximo efecto posible (MEP); $\% \text{ MEP} = 100 * (\text{latencia del test} - \text{latencia basal}) / (10 - \text{latencia basal})$. El grado de analgesia inducido por la morfina en el ratón durante las 2h siguientes a su administración fue el máximo detectable en este test; en la rata debido a la lenta liberación de la morfina por las minibombas se necesitaron 6h para alcanzar el máximo grado de analgesia. La respuesta alcanzó durante estos intervalos el tiempo máximo de corte establecido (10 segundos). El grado de analgesia fue disminuyendo paulativamente (tolerancia) hasta alcanzar, 48h después de la administración de morfina, valores semejantes a la respuesta observada en el grupo de animales placebo.

En animales tolerantes la interrupción de la administración del opioide da lugar a la expresión de la dependencia física, que se manifiesta con una serie de signos característicos que constituyen lo que se denomina "síndrome de abstinencia". Entre ellos, el más estudiado por su incidencia y fácil cuantificación objetiva es la ejecución repetitiva de saltos. Por tanto, el grado de dependencia a la morfina de los animales se determinó valorando la aparición e intensidad de este signo. Para determinar el desarrollo de dependencia a morfina se preparó un grupo de animales tolerantes distinto al que se utilizó para realizar las determinaciones bioquímicas. A estos

animales se les administró el antagonista opioide naloxona (5 mg/Kg, en el ratón y 1 mg/Kg en la rata, i.p.) 3 días después de la implantación de la morfina y se procedió a evaluar la conducta saltatoria de los animales. Después de la administración de la naloxona, los animales se introdujeron en una caja de metacrilato transparente registrándose el porcentaje de animales que presentaba la conducta saltatoria, así como la intensidad de dicha conducta durante los 10 min siguientes. En la **Tabla 3** se presentan los resultados obtenidos al precipitar el síndrome de abstinencia en el ratón y en la rata. En los grupos de animales tratados con placebo y en los tolerante-dependientes a la morfina se indican la presencia del signo e intensidad de la conducta saltatoria.

La mortalidad inducida en el ratón por el tratamiento crónico con la suspensión de morfina fue muy baja. La intensidad del síndrome de abstinencia que se obtuvo tras la administración de naloxona, reveló la aparición de niveles altos de dependencia (ver **Tabla 3**). Esto confirma la validez del método para el estudio de la tolerancia-dependencia a la morfina. Es una metodología sencilla y reproducible que garantiza la presencia de elevados niveles de morfina en plasma y tejido cerebral, (Maggiolo y Huidobro, 1961; Yoburn y col., 1985). Con la utilización de minibombas de liberación lenta, se desarrolla un grado de tolerancia-dependencia en la rata comparable al obtenido con otros métodos de administración crónica (implantación de los comprimidos tradicionales o administración de suspensión de morfina) (Adams y Holtzman, 1990).

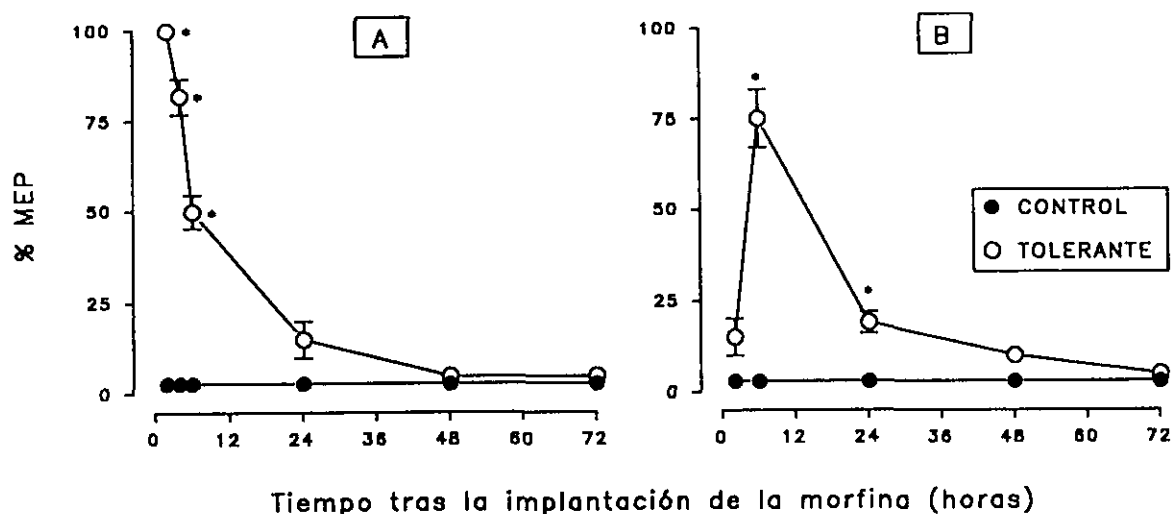


FIGURA 14. Curso temporal del desarrollo de la tolerancia al efecto analgésico de la morfina en el ratón (A) y en la rata (B). Todos los animales fueron implantados con morfina s.c., a las 0h. La analgesia se evaluó en el test del 'tail-flick', a distintos tiempos tras la implantación; los valores se expresan como la media±E.S.M. del % del máximo efecto posible (% MEP), de grupos de 10 animales cada uno. *Diferencias significativas respecto a los animales controles. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

TABLA 3

EXPRESION DEL SINDROME DE ABSTINENCIA EN EL RATON.		
Tratamiento	% animales	Nº saltos
Placebo Nx	---	n.d.
Morfina Salino	---	n.d.
Morfina Nx	95	30±2

EXPRESION DEL SINDROME DE ABSTINENCIA EN LA RATA.		
Tratamiento	% animales	Nº saltos
Placebo Nx	---	n.d.
Morfina Salino	---	n.d.
Morfina Nx	90	13±4

n.d : no detectable

Expresión del síndrome de abstinencia en el ratón y en la rata. 72h después de la implantación de la morfina se precipitó el síndrome de abstinencia con naloxona (Nx), i.p. 5 mg/Kg en el ratón y 1 mg/Kg en la rata. Se representa el porcentaje de animales que presentó la conducta saltatoria así como el número de veces que se produce, en grupos de 20 animales. La respuesta se evaluó durante los 10 minutos siguientes a la administración de la Nx.

2. Contenido de β -endorfina (1-31) y de N-acetil- β -endorfina (1-31) en estructuras del SNC e hipófisis: Efecto de la tolerancia-dependencia

La tolerancia y la dependencia se consideran respuestas fisiológicas adaptativas a la inhibición crónica de la función neural inducida por opioides exógenos. En este apartado del trabajo se ha estudiado la influencia de la tolerancia y dependencia a morfina sobre el sistema opioide endógeno de la rata y el ratón. Para ello se determinaron los niveles de los péptidos β -endorfina (1-31) (β -end) y de N-acetil- β -endorfina (1-31) (NAC) en cuatro grupos experimentales que se denominaron: control, tolerante 24h, tolerante 72h (implantados con morfina durante 24h o 72h) y abstinente (implantados con morfina durante 72h y sacrificados 24h después de la retirada de las minibombas o del agotamiento de las suspensiones oleosas (72h)).

2.1. Rata

Los niveles más elevados de β -end se encontraron en la hipófisis, seguida en orden decreciente por, tálamo, septum, estriado, hipotálamo, sustancia gris periacueductal (PAG), bulbo y resto de mesencéfalo. La NAC también presentó los mayores niveles en la hipófisis y fueron seguidos por los de tálamo, hipotálamo, PAG, septum, bulbo, estriado y resto de mesencéfalo.

Los efectos sobre los niveles de ambos péptidos de la administración crónica de morfina y de la abstinencia al opioide se muestran en la **Figura 15**. La morfina crónica disminuyó significativamente el contenido de β -end y NAC en todas las estructuras estudiadas a excepción del septum donde los niveles de NAC no se alteraron. Al intervalo estudiado, tras la retirada del opioide no se observó reversión de los efectos de la morfina. En general se detectaron disminuciones en el contenido, aunque en algunas regiones también pudieron observarse cambios en la relación β -end/NAC. En este sentido, en el septum y en el estriado, regiones que están implicadas en la expresión de la dependencia física (Sweep y col., 1989), se observó una proporción 4 veces menor a la del grupo control, proporción que se recuperó

en animales abstinentes.

En la **Figura 17** se representan los datos referentes a la hipófisis, en el lóbulo anterior de animales tolerantes, se observaron incrementos de los dos péptidos de carácter significativo aunque a distintos intervalos tras la implantación de la morfina (24h para β -end y 72h para NAC). Tras la desaparición de la morfina se reestablecieron los valores de animales controles para la NAC pero no para la β -end. En el lóbulo neurointermedio, sin embargo, la presencia de morfina no alteró el contenido de β -end pero disminuyó significativamente el de NAC. En animales abstinentes, los niveles de ambos péptidos se vieron incrementados con respecto al grupo control.

2.2. Ratón

En el cerebro de ratón, respecto al contenido de β -end, las estructuras se ordenaron de mayor a menor: hipófisis, PAG, tálamo, bulbo, hipotálamo, septum, estriado y resto de mesencéfalo. Para la NAC el orden fue: hipófisis, tálamo, hipotálamo, septum, bulbo, PAG, estriado y resto de mesencéfalo. Distribución muy parecida a la observada en el cerebro de la rata.

Los efectos sobre los niveles de ambos péptidos de la morfina crónica y de la abstinencia se muestran en la **Figura 16**. En hipotálamo y resto del mesencéfalo se produjo un incremento significativo en los niveles de los dos péptidos a las 24h de la implantación. Este efecto también se observó para NAC en el estriado, estructura en la que el contenido de β -end no se modificó a lo largo de la tolerancia. En el bulbo, la presencia crónica de morfina disminuyó la cantidad de ambos péptidos (siguiendo un patrón muy parecido al encontrado en la rata) mientras que en el septum sucedió lo contrario. En el PAG, sin embargo, los niveles de β -end aumentaron y los de NAC disminuyeron. En el tálamo, sólo se observaron cambios en el contenido de β -end.

La abstinencia no modificó el efecto ejercido por la morfina crónica en hipotálamo, bulbo y tálamo. En PAG, el contenido de β -end recuperó los valores del grupo control, pero los de NAC continuaron elevados. En el resto del mesencéfalo y el estriado, la retirada del opioide incrementó significativamente los niveles de los dos péptidos, aunque el aumento de NAC fue mayor. En el septum se produjo una disminución de β -end y NAC, en el caso de éste último péptido se recuperan los niveles de animales control.

En la **Figura 17** se presentan los datos de la hipófisis. Tanto la administración crónica de morfina como la abstinencia incrementaron los niveles de β -end pero no modificaron los de NAC, salvo en los animales sacrificados 24h tras la implantación en los que se detectó una acusada disminución en el contenido de éste péptido.

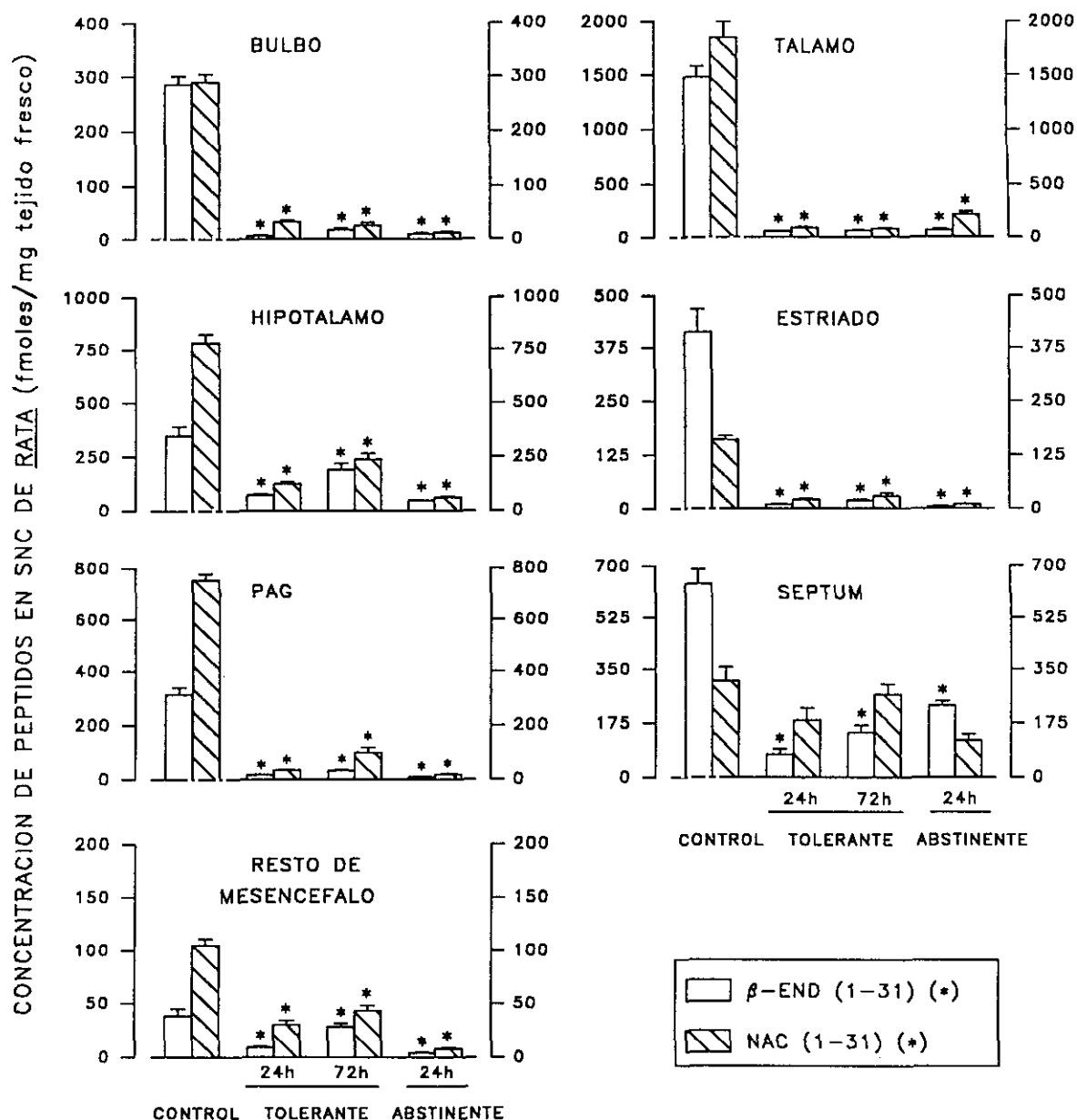


FIGURA 15. Niveles de β -endorfina (1-31) (β -end) y de N-acetil- β -endorfina (1-31) (NAC) en distintas regiones del SNC de ratas controles, implantadas s.c. con morfina durante 24h, 72h y luego de pasar el síndrome de abstinencia espontáneo. Los resultados están expresados en femtomoles de péptido por mg de tejido fresco; cada valor representa la media \pm ESM de al menos 6 determinaciones. * Diferencias significativas respecto a los animales control. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$. (PAG=sustancia gris periacueductal)

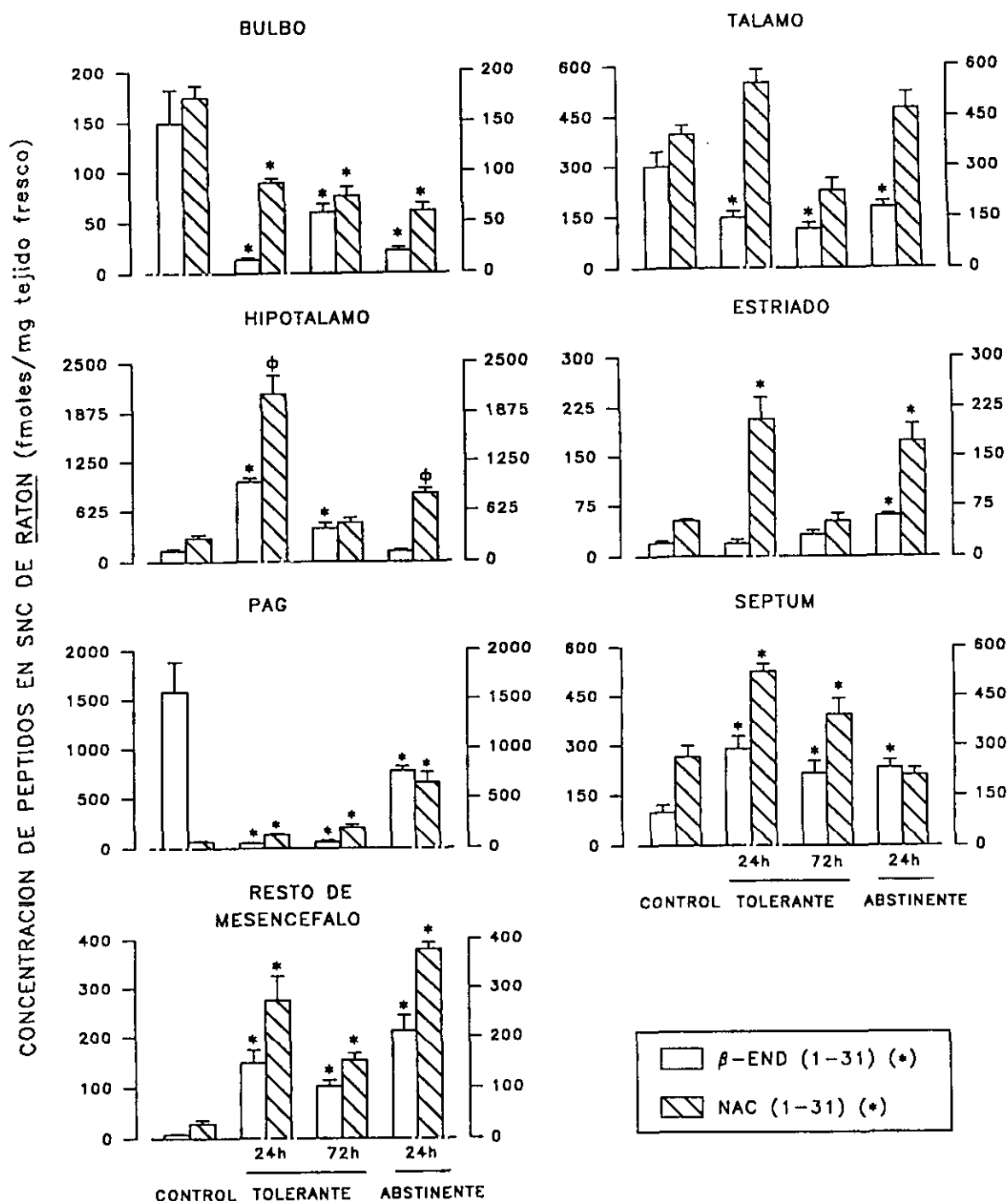


FIGURA 16. Niveles de β -endorfina (1-31) (β -end) y de N-acetil- β -endorfina (1-31) (NAC) en distintas regiones del SNC de ratones controles, implantados s.c. con morfina durante 24h, 72h y luego de pasar el síndrome de abstinencia espontáneo. Los resultados están expresados en fentomoles de péptido por mg de tejido fresco; cada valor representa la media \pm ESM de al menos 6 determinaciones. * Diferencias significativas respecto a los animales control. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$. (PAG=sustancia gris periacueductal)

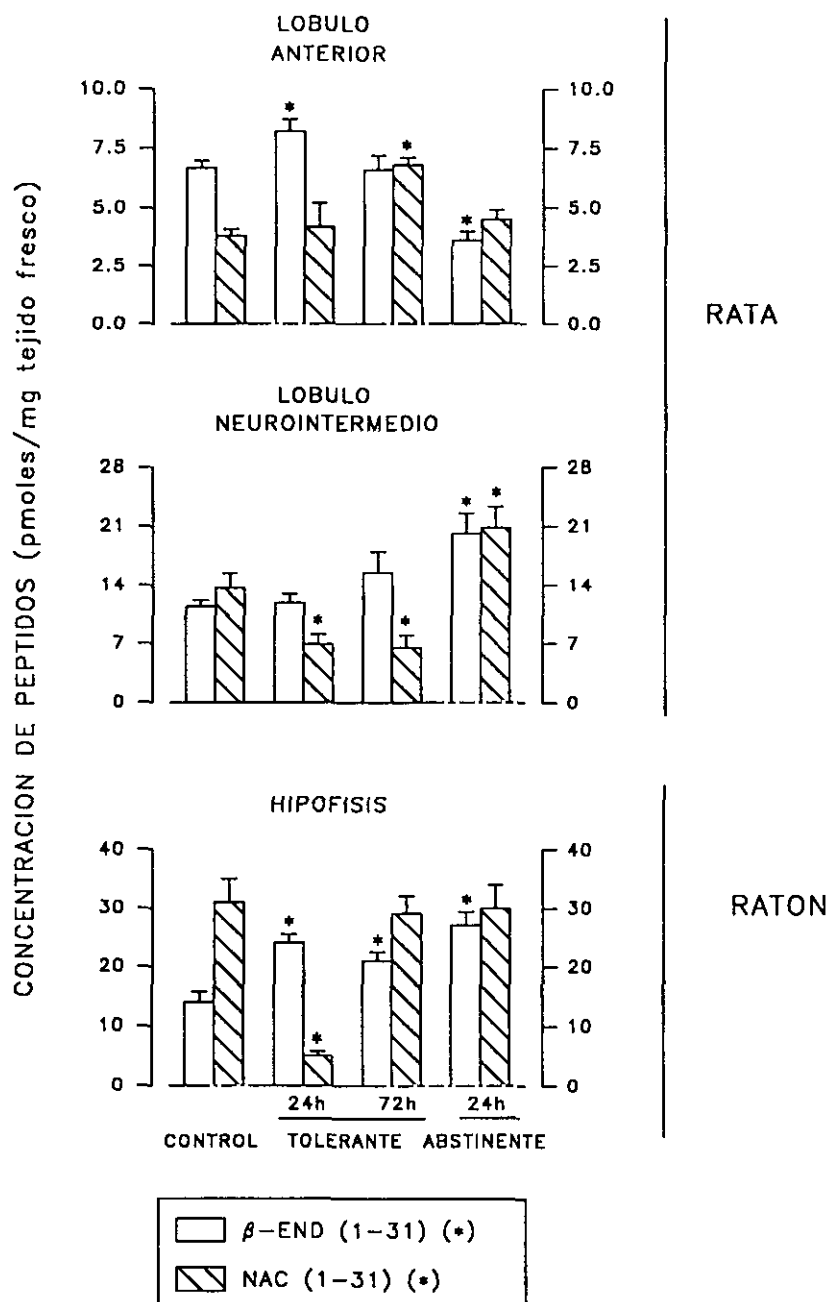


FIGURA 17. Niveles de β -endorfina (1-31) (β -end) y de N-acetil- β -endorfina (1-31) (NAC) en hipófisis de ratas (separada en lóbulo anterior y lóbulo neurointermedio) y de ratones controles, implantados s.c. con morfina durante 24h, 72h y luego de pasar el síndrome de abstinencia espontáneo. Los resultados están expresados en picomoles de péptido por mg de tejido fresco; cada valor representa la media \pm ESM de al menos 6 determinaciones. * Diferencias significativas respecto a los animales control. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

3. Actividad GTPásica de alta afinidad

3.1. Caracterización de la actividad GTPásica del SNC de ratón

3.1.1. Evolución en el tiempo de incubación

Como se observa en la **Figura 18**, la aparición de ^{32}Pi se relaciona linealmente con el tiempo hasta aproximadamente los 20 minutos de incubación a 37°C . Para los experimentos descritos en este trabajo se eligieron 10/20 min como tiempos de incubación. La hidrólisis debida a la actividad GTPásica de alta K_m se determinó en fracciones P_2 de cerebro total de ratón en presencia de 1 mM de GTP y se sustrajo de la determinada en presencia de 30 nM de GTP.

3.1.2. Influencia de la cantidad de proteína

La hidrólisis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ debida a la actividad GTPásica de alta K_m se determinó en fracciones P_2 y P_3 con y sin sacarosa de cerebro total de ratón en presencia de 1 mM de GTP y se sustrajo de la determinada en presencia de 30 nM de GTP. Como se observa en la **Figura 19**, la relación entre la cantidad de proteína en el ensayo y la hidrólisis de GTP durante 10 min a 37°C depende de la preparación de membrana utilizada. La linealidad se mantiene en todos los casos cuando la cantidad de proteína empleada es menor o igual a 5 μg . Sin embargo, en la **Figura 19** también se aprecia que a igualdad de cantidad de proteína se produce una mayor hidrólisis si se utilizan fracciones preparadas con sacarosa.

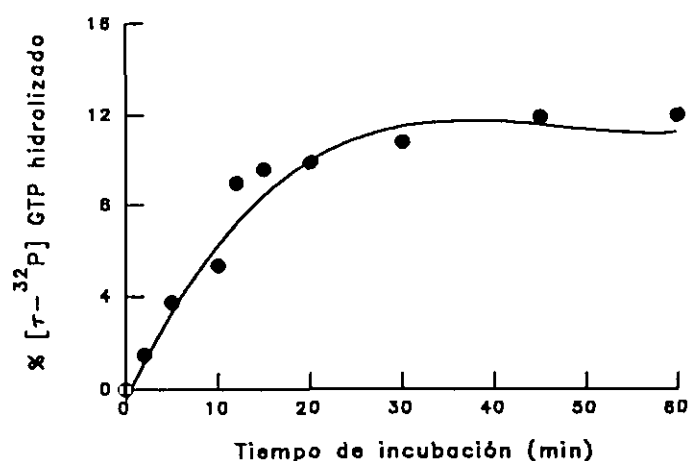


FIGURA 18. Actividad GTPásica de baja Km. Influencia del periodo de incubación. En ordenadas se representa el % [γ - 32 P]GTP hidrolizado y en abscisas el tiempo de incubación en minutos. Fracciones P_2 con sacarosa de cerebro total de ratón (3 μ g de proteína) se incubaron a distintos tiempos a 37°C.

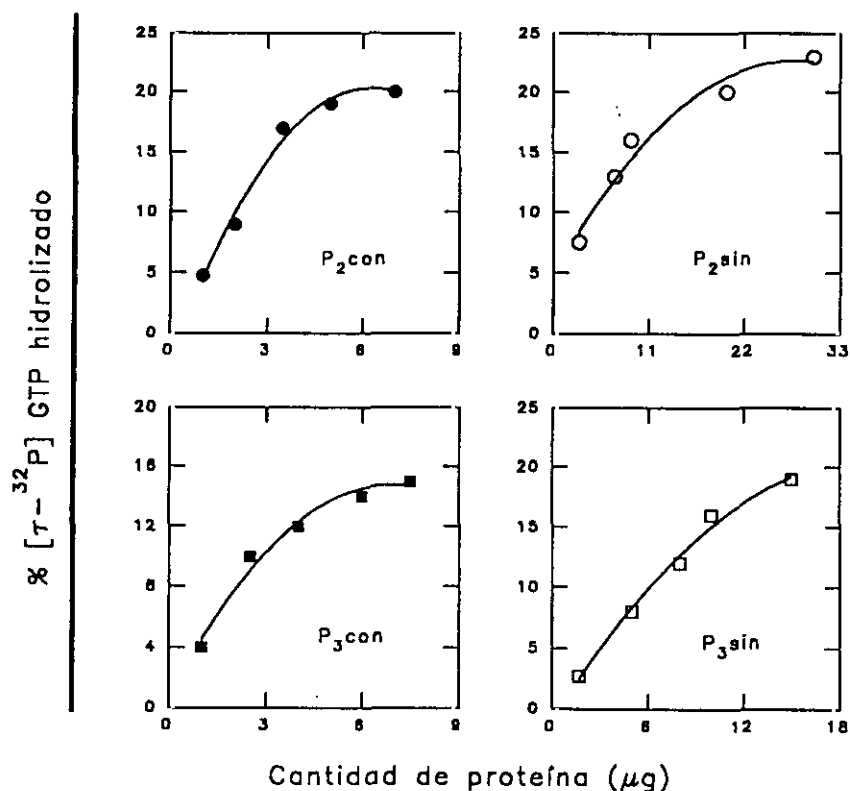


FIGURA 19. Actividad GTPásica de baja Km. Influencia de la cantidad de proteína. En ordenadas se representa el % [γ - 32 P]GTP hidrolizado y en abscisas la cantidad de proteína (en microgramos). Distintas cantidades de las fracciones P_2 y P_3 de cerebro total de ratón, preparadas con y sin sacarosa, se incubaron a 37°C durante 10 min.

3.1.3. Curvas de dilución del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$

Se realizaron curvas de dilución de GTP sin marcar en fracciones P_2 y P_3 con y sin sacarosa de cerebro total de ratón. Como se observa en la **Figura 20**, la hidrólisis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ se redujo en presencia de GTP frío incluso a concentraciones muy bajas (nótese que la escala del eje de ordenadas para la preparación P_3 sin es diferente). Esto indica que la actividad GTPásica (GTPasa) de baja K_m es la principal responsable de la hidrólisis de GTP en las distintas preparaciones de membrana de cerebro total de ratón. En este sentido, trabajos previos muestran que la actividad GTPásica está formada por dos componentes, uno de alta afinidad (saturable con concentraciones nanomolares de GTP) y uno de baja afinidad que aumenta linealmente en relación directa al aumento de la concentración de GTP (Cassel y Selinger, 1976).

El diagrama de Lineweaver-Burk de la actividad GTPásica es curvilíneo indicando que al menos dos enzimas con afinidades distintas por el sustrato, el GTP, participan en su hidrólisis (Aktories y Jakobs, 1981). Por tanto, la hidrólisis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ en membranas de cerebro de ratón se debe a la actuación de al menos dos componentes, uno de alta y otro de baja afinidad. La liberación de ^{32}Pi por la GTPasa de alta afinidad es saturable y puede estimarse en 60–80% de la hidrólisis total.

Con estos resultados se construyeron diagramas de Lineweaver-Burk, que se muestran en la **Figura 21**, para el componente GTPásico de alta afinidad en cada una de las preparaciones de cerebro total de ratón estudiadas: P_2 sin, P_2 con, P_3 sin y P_3 con. A partir de ellos se calcularon las K_m s aparentes (como se indicó en el apartado 2.4.3. de Materiales y Métodos) y que a continuación se detallan. Entre paréntesis aparecen los límites del intervalo de confianza al 95%.

P_2 sin $K_m = 0.367$ (0.331–0.406)

P_2 con $K_m = 0.183$ (0.152–0.214)

P_3 sin $K_m = 0.538$ (0.497–0.558)

P_3 con $K_m = 0.121$ (0.088–0.154)

La actividad GTPásica de las fracciones P_2 está asociada a las proteína G de la membrana plasmática, mientras que la observable en las fracciones P_3 es consecuencia de las proteínas G asociadas a los microsomas por ello, independientemente de sus características cinéticas, no es regulada por receptores (Ott y col., 1989). Esta es la razón por la que en este trabajo se hayan empleado fracciones de membrana P_2 , y dado que aquellas preparadas con sacarosa presentaron una mayor afinidad por el GTP, siempre se obtuvieron en presencia del azúcar.

La hidrólisis debida a la actividad GTPásica de alta K_m se determinó en presencia de 1 mM de GTP y se sustrajo de la determinada en presencia de las distintas concentraciones de GTP. La reacción se llevó a cabo durante 10 min a 37°C (condiciones experimentales definidas como protocolo inicial en el apartado 2.4.4. de Materiales y Métodos).

3.2. Estudio de la administración crónica de morfina sobre la actividad GTPásica de diferentes áreas del SNC del ratón

La hidrólisis debida a la actividad GTPásica de alta K_m en todos los experimentos que se detallan a continuación se determinó en fracciones P_2 con sacarosa preparadas a partir de distintas áreas del SNC de ratón. La concentración final de GTP en el medio de incubación fue de 30 nM. La GTPasa de alta K_m se definió tras restar la hidrólisis observada en presencia de 1 mM de GTP. Se realizó una incubación de 10 min a 37°C (definida como protocolo inicial en el apartado 2.4.4. de Materiales y Métodos).

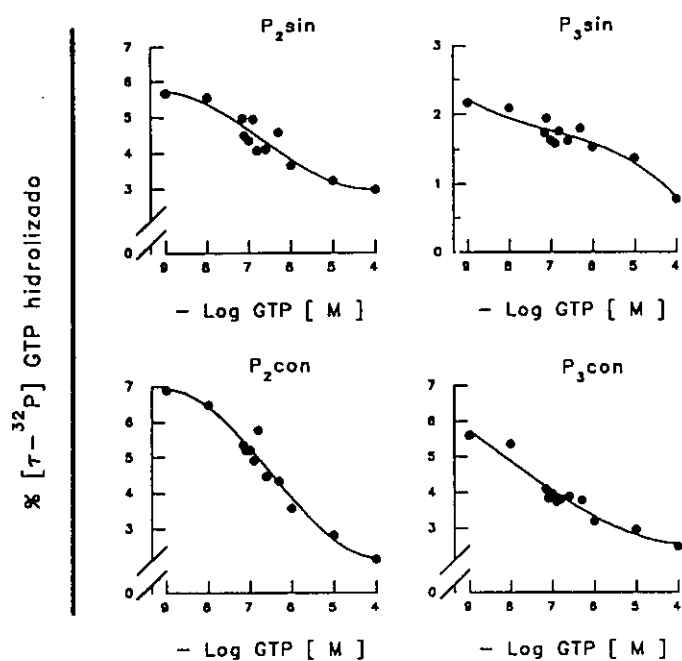


FIGURA 20. Actividad GTPásica de baja Km. Curvas de dilución de [γ-³²P]GTP para las distintas preparaciones de membranas de cerebro total de ratón. En ordenadas se representa el % [γ-³²P]GTP hidrolizado y en abscisas las concentraciones finales de GTP sin marcar presentes en el ensayo.

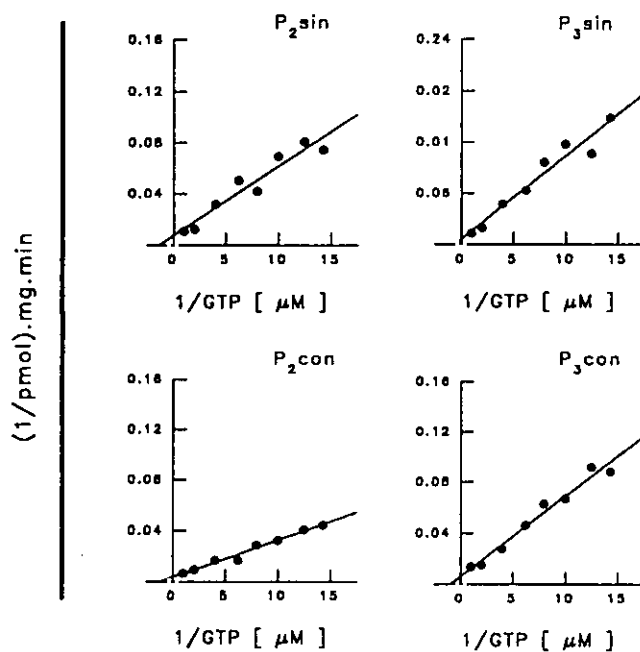


FIGURA 21. Diagramas de Lineweaver-Burk para la actividad GTPásica de baja Km en las distintas preparaciones de membranas de cerebro total de ratón. En ordenadas se representa la velocidad de la reacción enzimática como 1/picomoles hidrolizados.mg proteína.minuto y en abscisas la concentración de GTP (como 1/μM).

3.2.1. Distribución de la actividad GTPásica de alta afinidad en el SNC del ratón

La actividad GTPásica de baja Km presentó una distribución diferencial en las distintas zonas del SNC de ratón (**Tabla 4**). El hipotálamo, el resto del mesencéfalo (menos la sustancia gris periacueductal) y el estriado exhibieron una actividad GTPásica de baja Km significativamente mayor que la presentada por el bulbo. Los valores basales oscilaron entre los 6 pmoles/mg/min del bulbo y los 12 pmoles/mg/min del resto del mesencéfalo (resto).

La distribución de la GTPasa de baja Km sensible a la morfina tampoco es uniforme. Después de 3 días de exposición crónica a la morfina, el bulbo, la sustancia gris periacueductal (PAG), el resto y el hipotálamo presentaron una actividad GTPásica significativamente menor a la del estriado o el tálamo.

La actividad específica de la GTPasa de alta afinidad mostró diferencia significativas entre el grupo control y el tolerante-dependiente de distinto signo, así, en el tálamo de animales crónicamente implantados con morfina la hidrólisis de GTP aumenta mientras que en el PAG lo que se observa es una disminución. Existe una tendencia a la reducción de esta actividad enzimática en el resto y en la médula espinal de animales tolerante-dependientes. Por el contrario, este tratamiento no produjo ningún cambio en corteza, hipotálamo, estriado y bulbo (**Tabla 4**). Estas diferencias se encuentran ilustradas en la **Figura 22**.

TABLA 4. EFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE MORFINA SOBRE LA ACTIVIDAD GTPásica DE ALTA AFINIDAD EN DISTINTAS ESTRUCTURAS DEL SNC DE RATON.

HIDROLISIS DE GTP (pmoles/mg/min)		
ESTRUCTURAS	CONTROLES	TOLERANTES
Corteza	10.2 ± 0.9	10.3 ± 1.2
Tálamo	10.4 ± 0.9	15.1 ± 1.1*
Hipotálamo	9.6 ± 0.8	10.5 ± 1.1
Estriado	14.4 ± 1.4	13.9 ± 1.1
PAG	10.1 ± 0.8	6.4 ± 0.8*
Resto	11.4 ± 0.8	9.2 ± 0.6
Bulbo	6.03 ± 0.4	6.9 ± 0.7
Médula Espinal	9.9 ± 1.1	7.2 ± 0.7

Actividad GTPásica de alta afinidad en distintas estructuras del SNC de ratones tolerante-dependientes a morfina y controles. La tolerancia-dependencia a morfina se indujo por la liberación sostenida del alcaloide a partir de una suspensión de morfina conteniendo 75 mg de morfina base implantada subcutáneamente. Los animales se sacrificaron al tercer día de la implantación. Los resultados están expresados en picomoles de GTP hidrolizados por miligramo de proteína y minuto; cada valor representa la media±ESM de al menos 6 determinaciones. * Diferencias significativas entre animales tolerante-dependientes y controles. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p<0.05$. (PAG=sustancia gris periacueductal, Resto=resto del mesencéfalo).

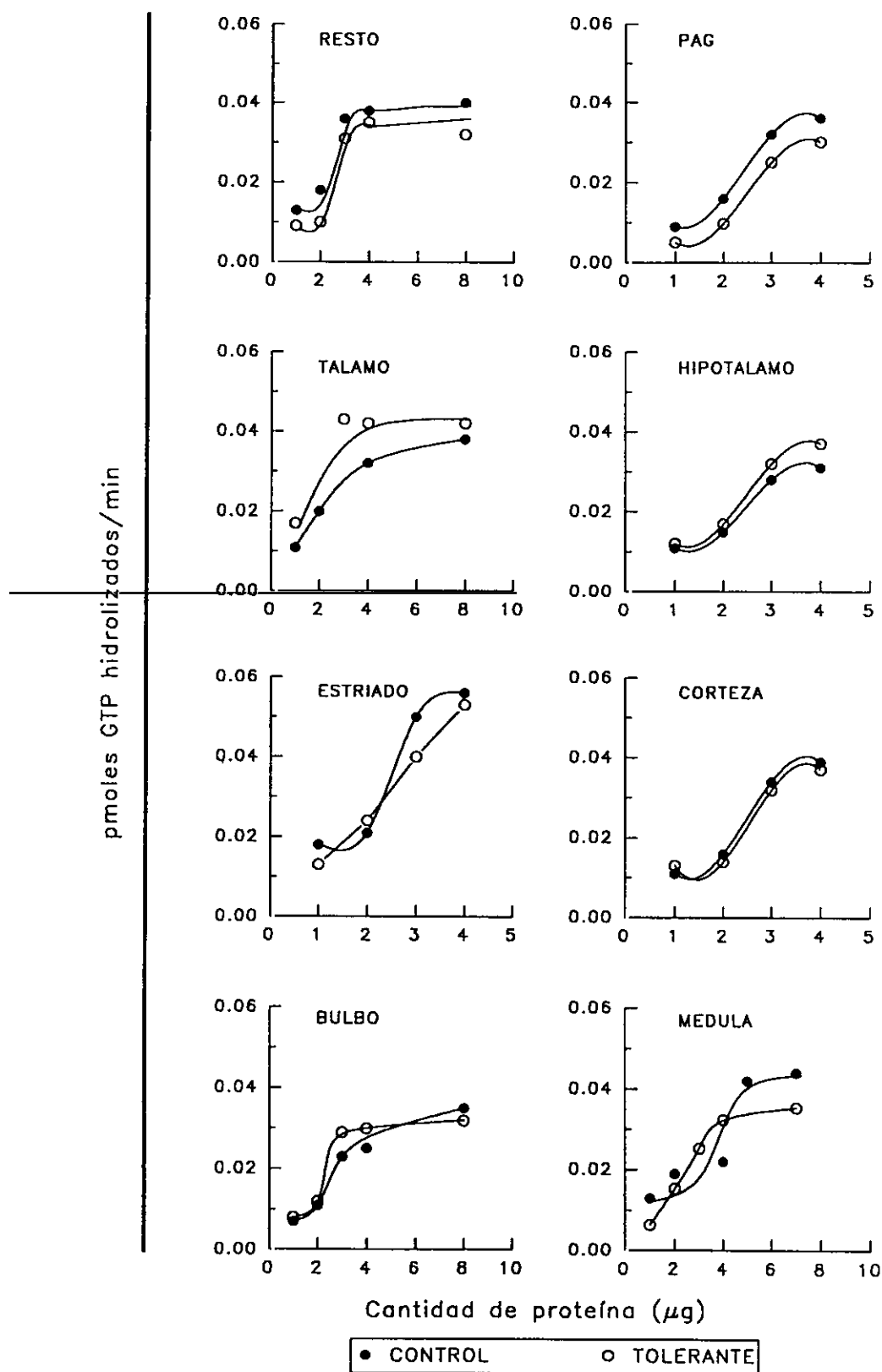


FIGURA 22. Actividad de la GTPasa de baja K_m en áreas del SNC de ratones controles y tolerante-dependientes de morfina. En ordenadas se representa la velocidad de la reacción (en picomoles de GTP hidrolizados por minuto) y en abscisas la concentración de proteína (en microgramos).

3.2.2. Características cinéticas de la actividad GTPásica de alta afinidad en el SNC de ratón

Se realizaron diagramas de Lineweaver-Burk del componente GTPásico de alta afinidad de las áreas neurales estudiadas en animales controles y en animales tolerante-dependientes a morfina. Se calcularon las Kms aparentes por análisis de regresión lineal, como se indicó en el apartado 2.4.3. de Materiales y Métodos. En controles los valores de las Kms oscilaron entre los mínimos de hipotálamo, resto y corteza ($0.193 \mu\text{M}$, $0.200 \mu\text{M}$ y $0.208 \mu\text{M}$) y los máximos del estriado y médula espinal ($0.300 \mu\text{M}$ y $0.308 \mu\text{M}$). Tras el tratamiento con morfina crónica se produjeron cambios con respecto a la situación control. Las Kms de estriado, PAG y médula espinal disminuyeron, mientras que las de hipotálamo y resto aumentaron. Los resultados están recogidos en la **Tabla 5**.

3.3. Efecto estimulador de los opioides sobre la actividad GTPásica

Reynolds (1969) y Jacquet y Lajtha (1973) pusieron de manifiesto que la estimulación eléctrica en núcleos de la sustancia gris periacueductal (PAG) o la inyección i.c.v. de opioides produce analgesia supraespinal. Estos autores sugirieron que los opioides estimulan ciertas vías inhibitorias de la transmisión nociceptiva en su camino hacia el tálamo y la corteza cerebral. El PAG también juega un papel importante en los mecanismos adaptativos relacionados con la tolerancia-dependencia a los opioides (Herz y col., 1970). Se ha observado que i) la inyección de antagonistas opioides en el PAG de ratas dependientes a morfina provoca la aparición de signos característicos del síndrome de abstinencia (Koob y Bloom, 1988) y que; ii) la administración de toxina pertúsica i.c.v. del ratón disminuye la analgesia provocada por distintos opioides (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1988) y atenúa los signos del síndrome de abstinencia que aparecen tras administrar naloxona a animales dependientes a morfina (Parolaro y col., 1990). En el efecto antinociceptivo de los opioides participan estructuras supraespinales y espinales (Takemori y Porthoghese, 1993; Kiefel y col., 1993). La administración crónica de morfina en estas localizaciones provoca la aparición de fenómenos de

tolerancia circunscritos al nivel de administración, por ello, se ha sugerido que los mecanismos implicados en la analgesia son independientes de los que participan en la tolerancia espinal y supraespinal (Siuciak y Advokat, 1987; Takahashi y col., 1991).

El estudio de la actividad GTPásica de baja K_m y su regulación por opioides se estudió principalmente en dos áreas del SNC estrechamente implicadas en los efectos analgésicos de estas sustancias, el PAG a nivel supraespinal y la médula espinal (ME). También se utilizaron células híbridas de neuroblastoma glioma NG 108-15 en las que se ha descrito una población homogénea de receptores opioides tipo δ . La actividad GTPásica de alta afinidad en las células NG 108-15 fue caracterizada por primera vez en 1981 por Koski y Klee, desde entonces, en la mayor parte de los trabajos en los que se ha abordado el estudio de esta actividad enzimática en relación con los opioides se han empleado membranas procedentes de estas células (Koski y col., 1982; Selley y Bidlack, 1992; Vachon y col., 1986).

En los experimentos que se detallan a continuación se trabajó con fracciones de membrana P_2 preparadas con sacarosa y se utilizó el protocolo de preincubación en frío (2h a 4°C) seguido de una incubación de 20 min a 37°C. Se utilizaron estas fracciones porque, como ya se ha señalado con anterioridad, en las fracciones P_3 , al carecer de receptores para neurotransmisores, no es posible observar estimulación por agonistas (Ott y col., 1989). En estas condiciones experimentales, la actividad basal de la GTPasa de alta afinidad (calculada como la diferencia entre la hidrólisis de GTP determinada en presencia de 3 μM de GTP y la determinada con 1 mM de GTP) osciló a lo largo del estudio entre 70 y 125 pmoles/mg/min en el PAG, entre 50 y 90 pmoles/mg/min en la ME, y entre 60 y 90 pmoles/mg/min en las células NG 108-15. Los valores basales de la actividad GTPásica de alta afinidad en cerebro son mucho mayores que los observados en otros tejidos (Aktories y Jakobs, 1981; Cassel y Selinger, 1976).

TABLA 5. EFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE MORFINA SOBRE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE LA ACTIVIDAD GTPásica DE ALTA AFINIDAD EN DISTINTAS ESTRUCTURAS DEL SNC DE RATON.

ESTRUCTURAS	Km [μ M]	
	CONTROLES	TOLERANTES
Corteza	0.208 \pm 0.014	0.234 \pm 0.016
Tálamo	0.220 \pm 0.015	0.188 \pm 0.013
Hipotálamo	0.193 \pm 0.013	0.357 \pm 0.024*
Estriado	0.308 \pm 0.020	0.193 \pm 0.013*
PAG	0.271 \pm 0.018	0.192 \pm 0.013*
Resto	0.195 \pm 0.013	0.287 \pm 0.020*
Bulbo	0.239 \pm 0.016	0.236 \pm 0.017
Cerebelo	0.205 \pm 0.015	0.252 \pm 0.016
Médula espinal	0.299 \pm 0.020	0.201 \pm 0.014*

Constantes de afinidad (Km) de la actividad GTPásica de alta afinidad en distintas estructuras del SNC de ratones tolerante-dependientes a morfina y controles. La tolerancia-dependencia a morfina se indujo por el procedimiento descrito en la Tabla 4 y en el capítulo de Materiales y Métodos. Los animales se sacrificaron al tercer día de la implantación. Los resultados están expresados en concentración micromolar de GTP; cada valor representa la media \pm ESM de al menos 3 determinaciones, cada una de ellas de al menos 6 puntos. * Diferencias significativas entre animales tolerante-dependientes y controles. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$. (PAG=sustancia gris periacueductal, Resto=resto del mesencéfalo).

En la **Figura 23** se ilustra la estimulación de la actividad GTPásica del PAG de ratón por el agonista opioide DADLE ([D-Ala²,D-Leu⁵]-encefalina) 1 µM utilizando los protocolos inicial y de preincubación en frío. En ambas situaciones el agonista aumentó la hidrólisis de GTP observándose los incrementos mayores con el protocolo de preincubación en frío. En este caso los aumentos se empiezan a producir con concentraciones de sustrato más bajas.

En la **Tabla 6** se muestra la necesidad de la presencia de NaCl en el medio de incubación para que pueda observarse el efecto regulador de los agonistas sobre la actividad enzimática que nos ocupa. En la tabla puede apreciarse que en ausencia del ión sodio aunque la actividad GTPásica basal es elevada, sin embargo, los receptores y las proteínas G carecen de un acoplamiento eficaz (Koski y col., 1982).

TABLA 6. EFECTO DE LOS AGONISTAS OPIOIDES SOBRE LA ACTIVIDAD GTPásica DE ALTA AFINIDAD. INFLUENCIA DEL SODIO.

NaCl [mM]	Actividad GTPásica (pmol/mg/min)		
	Basal	DADLE 1 µM	β-end 1 µM
0	109±6	110±9	112±8
100	70±4	127±6*	116±8*

La actividad GTPásica basal de alta afinidad del PAG de ratón se determina durante 20 min a 37°C. Previamente las membranas han sido preincubadas durante 2h a 4°C con los agonistas arriba indicados. Los resultados están expresados en picomoles de GTP hidrolizados por mg de proteína y minuto; cada valor representa la media±ESM de al menos 6 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, p<0.05.

El efecto de la naloxona (antagonista opiode no selectivo) y el ICI 174864 ([N,N-dialil-Tyr-(ácido α -aminoisobutírico)₁-Phe-Leu-OH] antagonista selectivo para los receptores opioides δ) sobre la GTPasa de baja Km del PAG de ratón se encuentran representados en la **Figura 24**. Sólo la naloxona a concentraciones en el rango micromolar muy alto (100 μ M) provocó un incremento de un 20% sobre la actividad basal. El ICI 174864 produjo un incremento aunque moderado, pero concentración-dependiente de la actividad GTPásica del tejido. A la vista de estas curvas se eligieron 10 μ M y 1 μ M como concentraciones de trabajo para la naloxona y el ICI 174864, respectivamente. Estas concentraciones apenas elevaron en un 10% la actividad enzimática y resultaron ser efectivas en el antagonismo del efecto estimulador de los agonistas.

En la **Figura 25** se muestran las curvas concentraciones-efecto para la estimulación de la hidrólisis de GTP del PAG del ratón por los opioides DAGO ([D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]-encefalina), morfina, β -endorfina (1-31) (β -end), N-acetil- β -endorfina (1-31) (NAC) y DADLE ([D-Ala²,D-Leu⁵]-encefalina). Se muestra el efecto que los antagonistas opioides naloxona e ICI 174864 ejercen sobre dicha estimulación. DAGO, morfina y DADLE se ensayaron en el rango de concentraciones 1 nM-10 μ M y los péptidos endógenos β -end y NAC en el rango 1 nM-1 μ M. A dosis micromolares la morfina produjo la estimulación más elevada, seguida de DADLE, DAGO y β -end. En estas condiciones experimentales, la NAC no afectó la actividad GTPásica de baja Km, lo que en principio resulta lógico si se tiene en cuenta que no se une a los receptores opioides (Smyth y col., 1979).

Los efectos sobre la GTPasa del DAGO (ligando selectivo de los receptores μ) y de la morfina (agonista preferencial de los receptores μ) fueron antagonizados por la naloxona pero no por el ICI 174864. Las activaciones de la GTPasa producidas por el DADLE (agonista δ/μ) y la β -end (opioide endógeno μ/δ) se antagonizaron por naloxona e ICI 174864. Con respecto a la NAC, su combinación con los antagonistas resultó en una activación de la GTPasa, especialmente con la naloxona combinándola con las concentraciones más bajas del péptido.

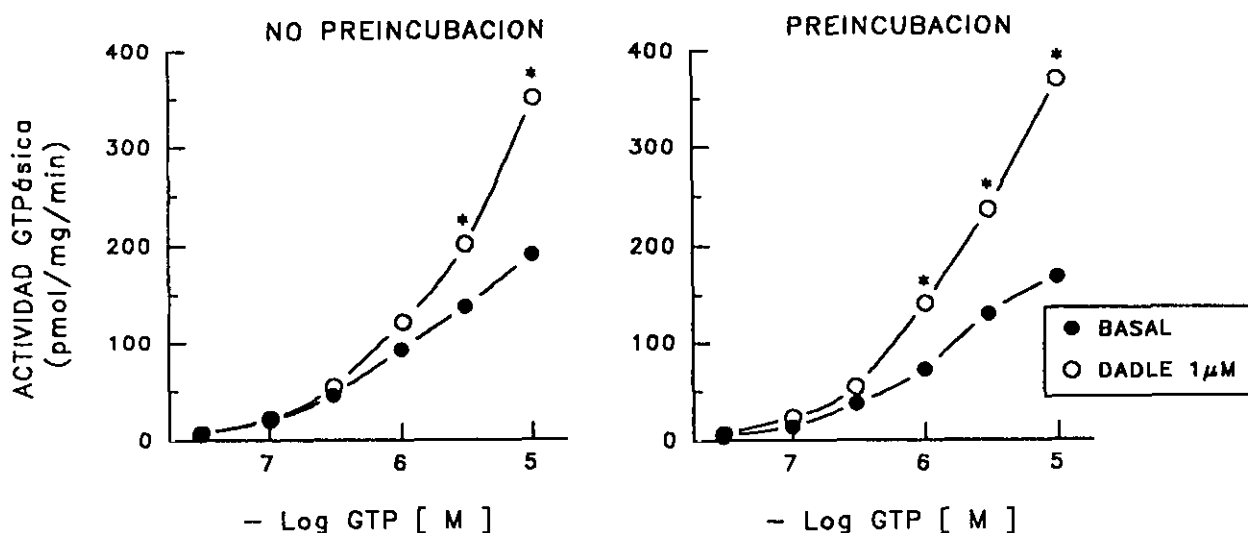


FIGURA 23. Comparación de dos protocolos experimentales en la estimulación por el agonista DADLE 1 μ M de la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón determinada tras 20 min de incubación a 37°C. Preincubación: las membranas se preincubaron durante 2h a 4°C con DADLE 1 μ M. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

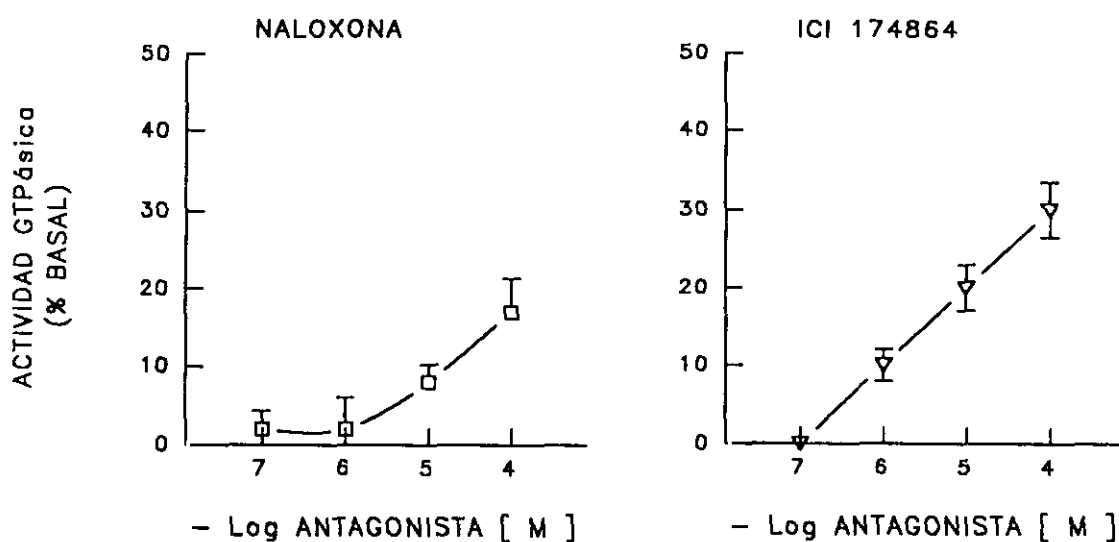


FIGURA 24. Efecto de los antagonistas opioides naloxona e ICI 174864 sobre la actividad GTPásica de alta afinidad en membranas del PAG de ratón. El valor basal fue de 80 ± 5 pmoles/mg/min. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 6 determinaciones.

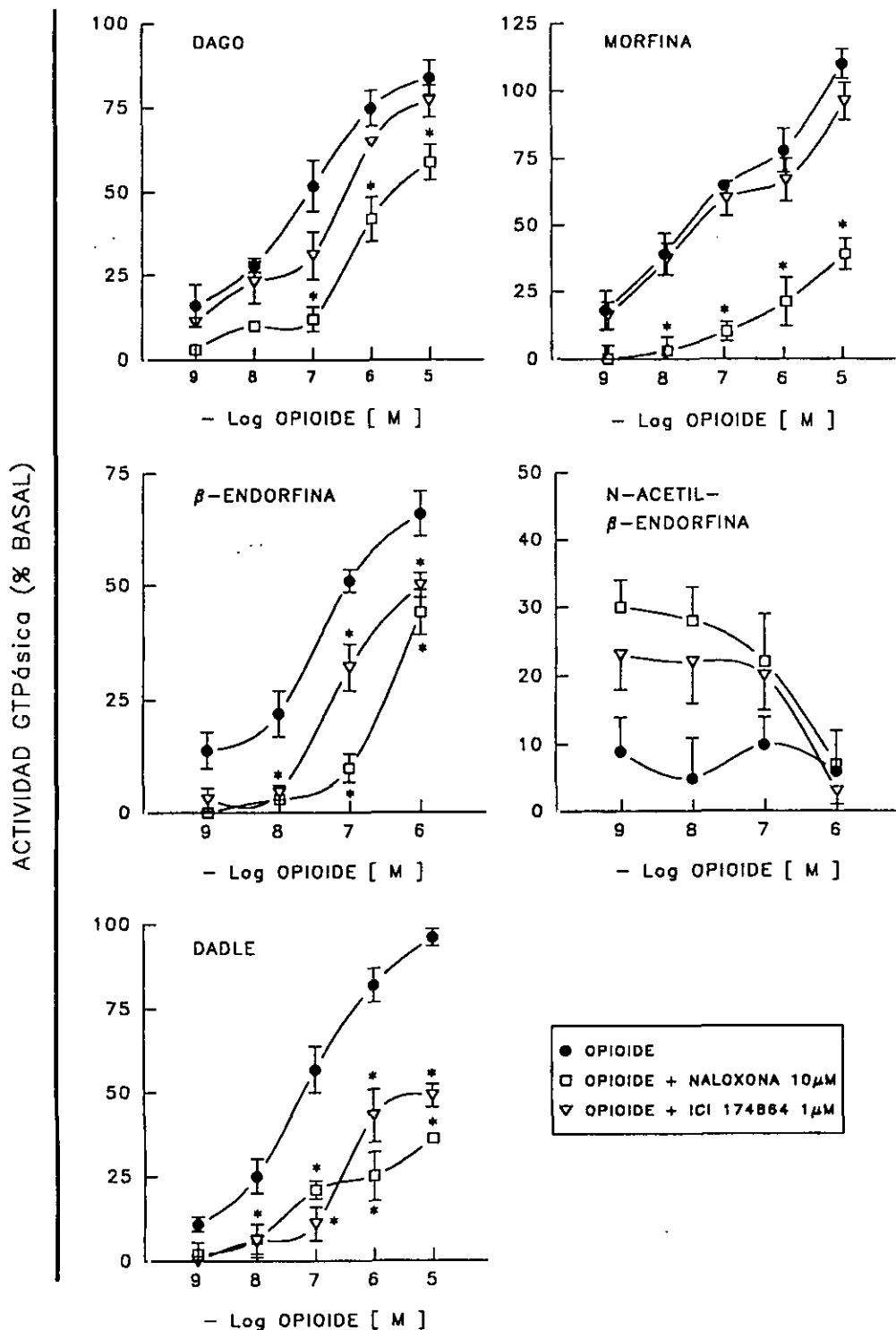


FIGURA 25. Estimulación por los agonistas opioides de la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón. Los datos están expresados en porcentaje de aumento con respecto a la actividad basal (estimada en 95 ± 9 pmoles de GTP hidrolizados/mg/min). Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 6 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

En la **Figura 26** se muestran las curvas concentraciones-respuesta para la estimulación de la hidrólisis de GTP del PAG del ratón por los agonistas opioides selectivos del receptor δ , DPDPE ([D-Pen^{2,5}]-encefalina) y [D-Ala²]-Deltorfina II. Así mismo se representa el efecto que los antagonistas opioides naloxona e ICI 174864 a las concentraciones 10 μ M y 1 μ M respectivamente, ejercen sobre dicha estimulación. Los péptidos se ensayaron en el rango de concentraciones 1 nM-1 μ M. A concentraciones micromolares, la [D-Ala²]-Deltorfina II resultó ser más efectiva en estimular la actividad GTPásica que el DPDPE. Sin embargo, en el rango nanomolar el DPDPE fue más potente en incrementar la liberación de ³²Pi respecto a la [D-Ala²]-Deltorfina II. DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II fueron más sensibles al antagonismo por ICI 174864, aunque la naloxona también revertió su efecto estimulatorio.

Trabajos previos de nuestro grupo realizados "in vivo" habían puesto de manifiesto que la NAC regulaba los efectos antinociceptivos de diferentes opioides, entre ellos β -end, DAGO y morfina (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1991; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1992a). Por ello, se procedió a explorar el posible efecto de la NAC sobre la estimulación ejercida por los agonistas opioides sobre la actividad GTPásica de baja Km en el PAG de ratón. Los resultados de la combinación de la β -end y de su derivado acetilado sobre la actividad GTPásica de alta afinidad en el PAG de ratón se ilustran en la **Figura 27**. Aunque la administración i.c.v. de NAC reduce el efecto analgésico de la β -end (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1991), no se observó antagonismo sobre la estimulación de la GTPasa producida por la β -end. El efecto estimulatorio de los agonistas DAGO (1 μ M) y morfina (1 μ M) sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón tampoco se vió modificado por la presencia de concentraciones crecientes de NAC (**Figura 28**). Al estudiar concentraciones crecientes de β -end en combinación con una concentración fija (1 μ M) de DAGO o de morfina se observó una sumación de los efectos de los dos agonistas (ver **Figura 28**).

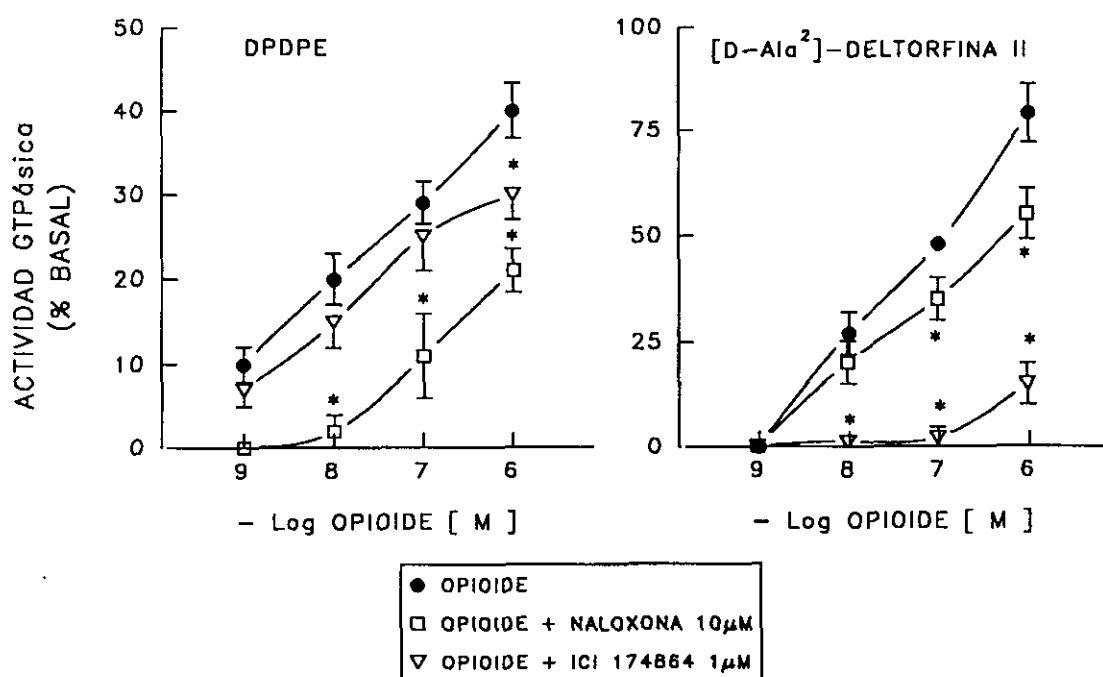


FIGURA 26. Estimulación de la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón por los agonistas opioides DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II. Los datos están expresados en porcentaje de aumento con respecto a la actividad basal (estimada en 95 ± 9 pmoles de GTP hidrolizados/mg/min). Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 6 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

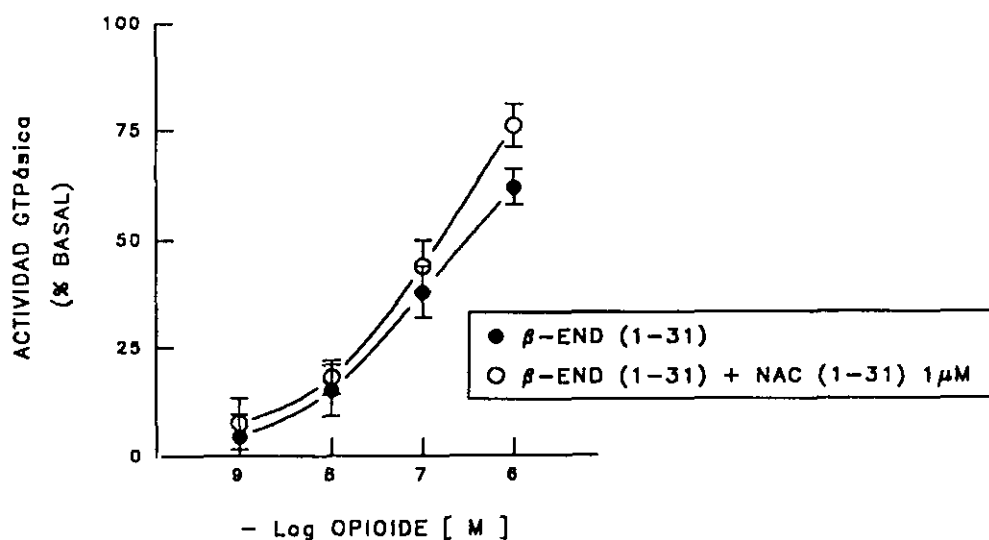


FIGURA 27. Curva concentración-efecto de la estimulación de la actividad GTPásica de alta afinidad en el PAG de ratón por el péptido opioide endógeno β-endorfina (1-31) (β-end). Combinación con una concentración 1 µM de su derivado N-acetilado (NAC). La actividad enzimática basal fue de 83 ± 7 pmoles/mg/min. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 6 determinaciones.

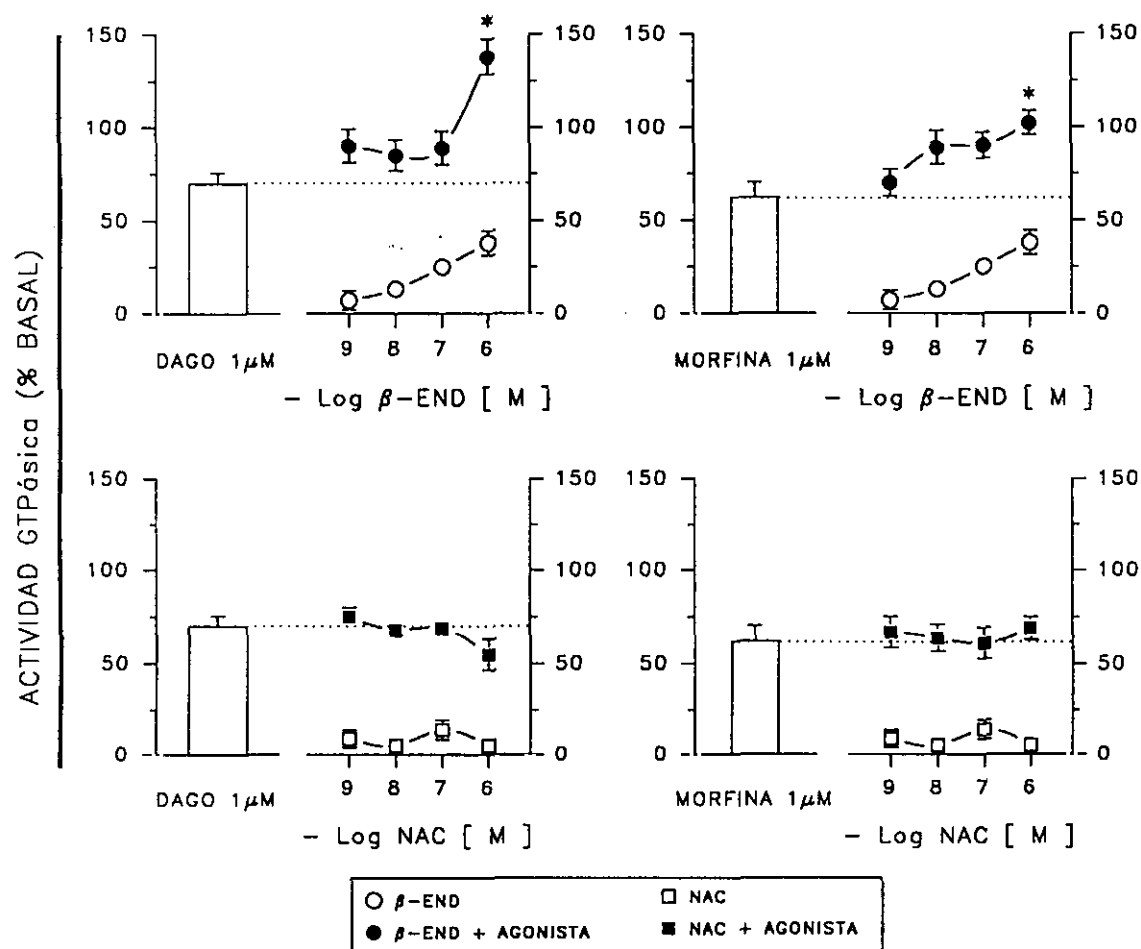


FIGURA 28. Efecto de concentraciones crecientes de los péptidos endógenos β-endorfina (1-31) (β-end) y N-acetil-β-endorfina (1-31) (NAC) sobre la estimulación de la actividad GTPásica de alta afinidad promovida por los agonistas opioides DAGO y morfina. La actividad enzimática basal fue de 75 ± 8 pmoles/mg/min. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 6 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a la situación control, definida en presencia de agonista únicamente. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

En la línea celular NG 108-15 los agonistas opioides DAGO, morfina, DADLE, DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II presentaron unos perfiles de estimulación de la GTPasa de alta afinidad que se ilustran en la **Figura 29**. Los agonistas se estudiaron desde el rango nanomolar hasta el micromolar. Todos, incluidos el agonista μ -selectivo DAGO y la morfina, provocaron incrementos en la hidrólisis de GTP aunque la estimulación máxima se consiguió con DADLE y [D-Ala²]-Deltorfina II. El DPDPE estimuló la actividad enzimática desde concentraciones nanomolares, actividad que se va incrementando en relación directa con la concentración del péptido, aunque nunca alcanza los valores de activación provocados por el DADLE o la [D-Ala²]-Deltorfina II.

En la **Figura 29** también se presenta el antagonismo ejercido por el ICI 174864 y por el antagonista selectivo de los receptores μ , CTOP (análogo de la somatostatina y de secuencia Cys², Tyr³, Orn⁵, Pen⁷ amida) sobre la estimulación de la GTPasa promovida por los agonistas antes señalados. El único de ellos que no fue sensible al ICI 174864 fue el DAGO. La naloxona antagonizó el efecto estimulador de todos ellos.

3.3.1. Modificación de la actividad GTPásica sensible a opioides por antisueros generados frente a las subunidades G₁₂ α y G₁₃ α de las proteínas G

La caracterización de los antisueros empleados en los experimentos que se detallan a continuación está recogida en el apartado 2.2.2. de Materiales y Métodos. En general, se utilizó para los tratamientos "in vitro" uno de los siguientes protocolos experimentales:

Protocolo 1. Preincubación de 1h a 37°C del medio de incubación con las membranas, las IgGs purificadas por afinidad y el GTP; seguida de una incubación de 20 min a 37°C tras la adición a la mezcla anterior del [γ -³²P]GTP y las sustancias a estudiar.

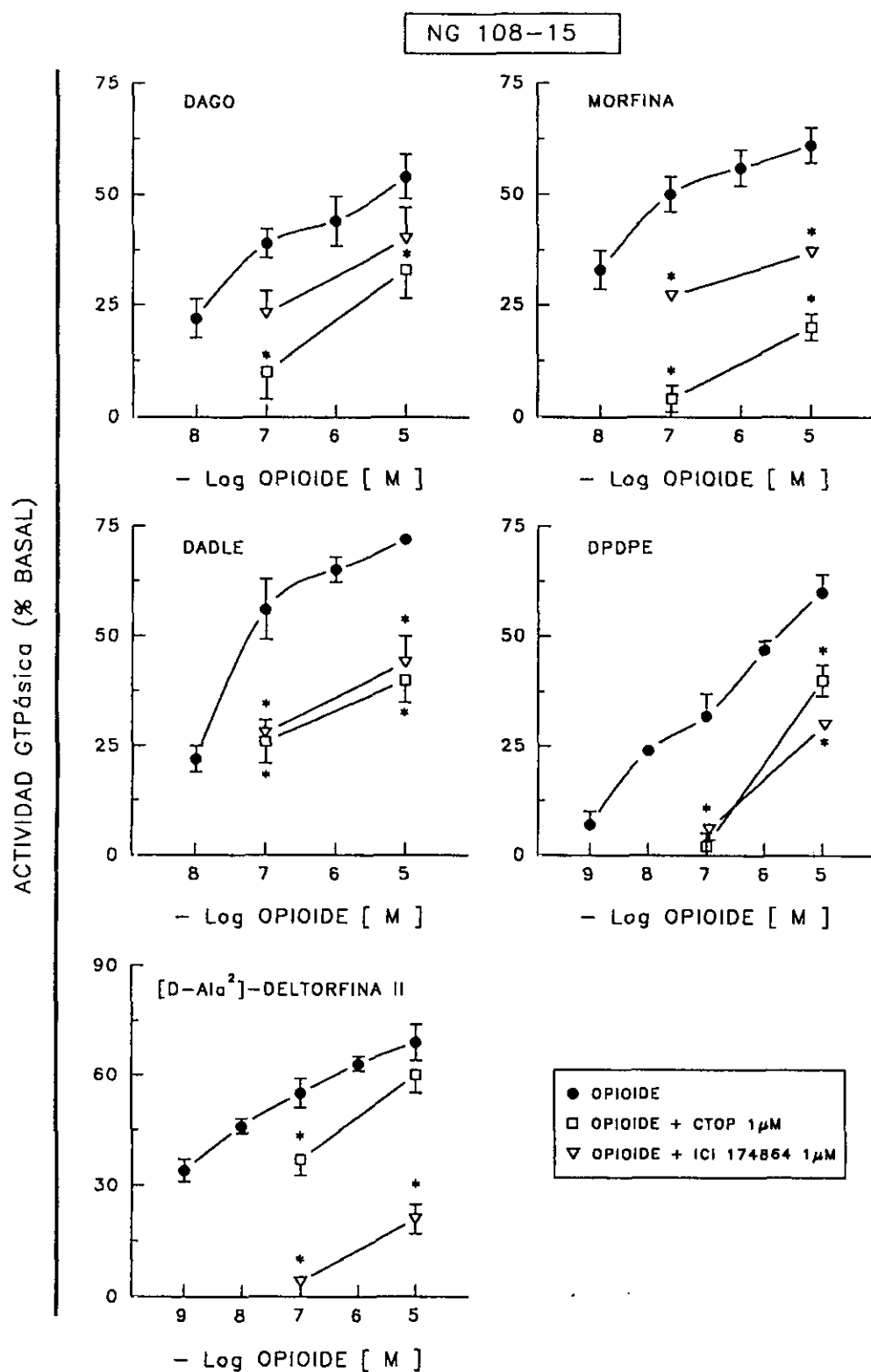


FIGURA 29. Estimulación por agonistas opioides de la actividad GTPásica de baja K_m de células NG 108-15. Cada valor representa la media±ESM de al menos 6 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales, definidos como una hidrólisis de GTP de 63 ± 7 pmoles/mg/min. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

Protocolo 2. Preincubación de 1h a 37°C del medio de incubación con las membranas, las IgGs purificadas por afinidad y las sustancias a estudiar; seguida de una incubación de 20 min a 37°C tras la adición a la mezcla anterior del [γ - 32 P]GTP y el GTP.

La preincubación de las membranas a 37°C provoca un cierto deterioro de la enzima. De hecho, en las membranas de PAG se observó una disminución del 50% en la liberación de 32 Pi cuando se utilizaba el protocolo 1 y del 75% cuando se utilizaba el protocolo 2. La hidrólisis de GTP se determinó, en la mayoría de los experimentos, en presencia de GTP 3 μ M. Sin embargo, en ocasiones se utilizaron concentraciones de GTP de 30 μ M. Como ya se apuntó en el apartado 2.4.4. de Materiales y Métodos, el protocolo inicial fue el protocolo 1. Los sueros preinmunes, también purificados por afinidad, no modificaron la respuesta GTPásica de las membranas frente a las sustancias ensayadas.

En primer lugar se estableció, en estas condiciones experimentales, la estimulación inducida por distintos opioides (DAGO, morfina, β -end, NAC, DADLE, DPDPE y [D-Ala 2]-Deltorfina II) sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón. Se ensayaron concentraciones fijas de ligando (1 μ M para los ligandos endógenos y 10 μ M para los demás) frente a concentraciones crecientes de GTP. A concentraciones altas de GTP (3-30 μ M) los opioides produjeron la mayor activación sobre la GTPasa basal, sin embargo, estas concentraciones de GTP (en especial, 30 μ M) producían una elevada dilución del sustrato radiactivo, por ello se eligió 3 μ M de GTP como concentración de sustrato presente en el ensayo. Estos experimentos están recogidos en las **Figura 30**.

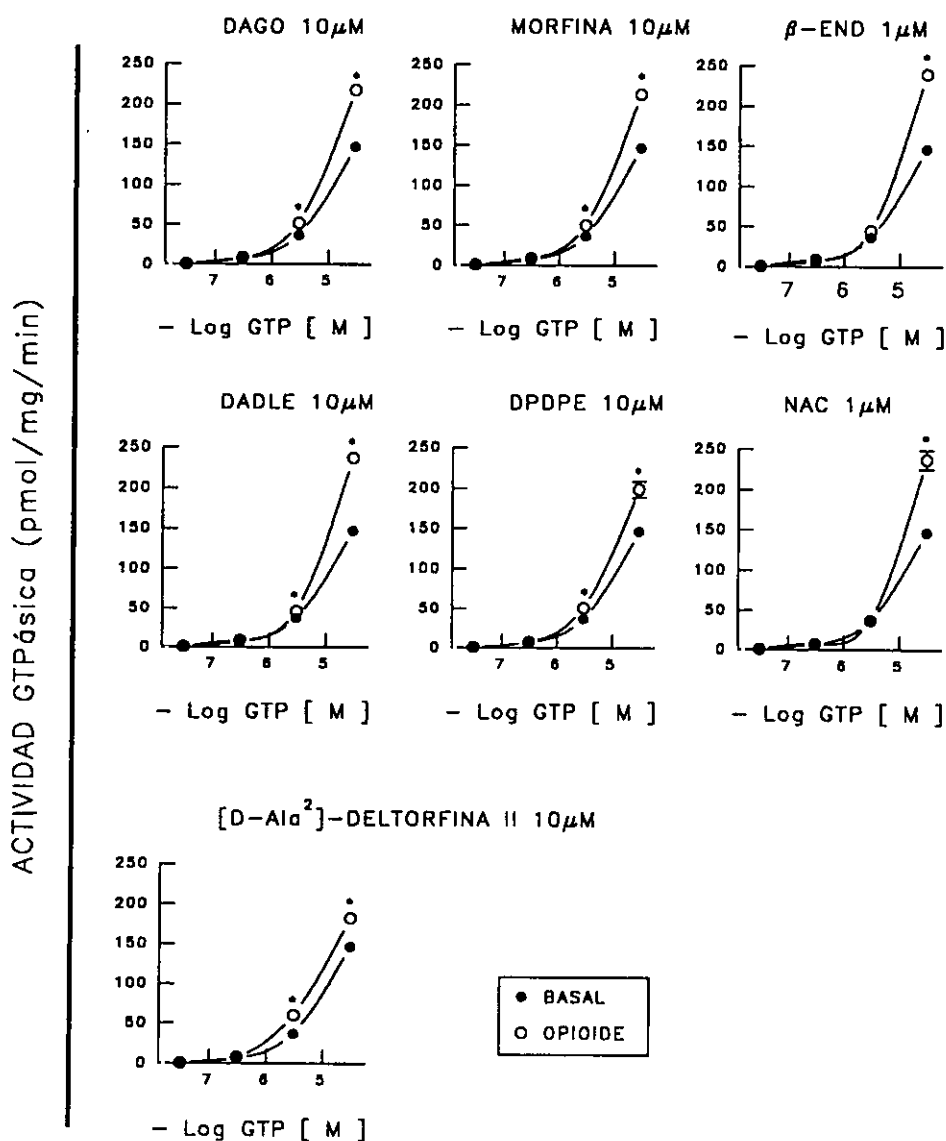


FIGURA 30. Influencia de la concentración de GTP en la estimulación provocada por distintos opioides sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón en el protocolo 1. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 6 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

A continuación se evaluó el efecto de los antisueros anti-G₁₂ α y anti-G_{z/z} α sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG sensible a opioides siguiendo el protocolo 1 a una concentración de GTP 3 μ M. El anti-G₁₂ α modificó la respuesta de la enzima frente al DAGO, morfina, β -end, DADLE, DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II (**Figuras 31 y 32**). Se vieron antagonizados, por tanto, los efectos de agonistas tipo μ y de agonistas tipo δ . En estas condiciones, 3 μ M GTP, el antisuero anti-G_{z/z} α no logró modificar la respuesta de la GTPasa a estos opioides (**Figura 33**).

Los requerimientos de sustrato para la subunidad G_{z/z} α son mayores que para las G₁ α y las G_o α , de hecho, se ha descrito una velocidad de intercambio de nucleótidos de guanina muy lenta para esta subunidad (Casey y col., 1990). De acuerdo con esta premisa, se utilizó una concentración mayor de GTP (30 μ M). En estas nuevas condiciones, en membranas de PAG de ratón incubadas en presencia del antisuero anti-G_{z/z} α los agonistas DAGO, morfina y β -end vieron disminuido su efecto estimulador de la hidrólisis de GTP (**Figuras 31 y 32**). En general, se puede observar que a mayor selectividad por el receptor μ se corresponde un mayor deterioro causado por el anti-G_{z/z} α .

A continuación, los dos antisueros se ensayaron frente a la misma concentración de GTP (3 μ M) siguiendo el protocolo 2. Los resultados están representados en la **Figura 34** en la que se observa que tras prolongar el tiempo de incubación, el anti-G_{z/z} α funciona a las mismas concentraciones de sustrato que el anti-G₁₂ α y modifica la respuesta del PAG de ratón únicamente frente a los opioides DAGO y morfina. Por otra parte, el anti-G₁₂ α se comporta igual que en el protocolo 1. Utilizando el protocolo 2 los antisueros anti-G₁₂ α y anti-G_{z/z} α lograron modificar la respuesta GTPásica del PAG de ratón para el DAGO y la morfina (10 μ M) incluso a concentraciones menores de GTP 3 μ M (**Figura 35**).

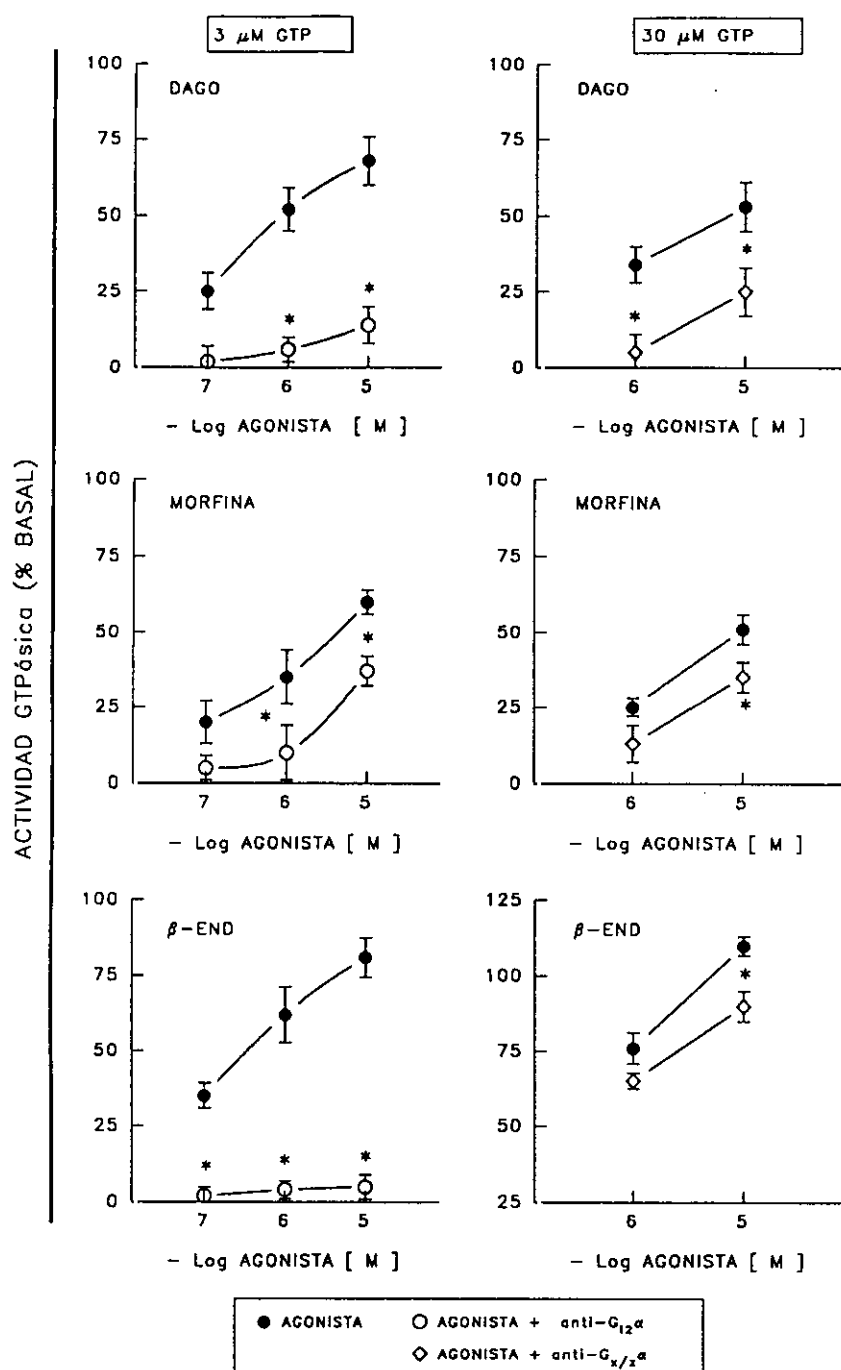


FIGURA 31. Efecto de los antisueros anti-G₁₂α y anti-G_{x/z}α (protocolo 1) sobre la estimulación provocada por los agonistas opioides DAGO, morfina y β-end (1-31) de la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón. Las concentraciones de antisueros empleadas fueron (en μg/μg de proteína) de 0.82 y 0.17 para el anti-G₁₂α y anti-G_{x/z}α, respectivamente. Cada valor representa la media±ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales, que presentaron una actividad enzimática de 50±5 y de 120±10 pmoles de GTP/mg/min para 3 μM y 30 μM de concentración de sustrato, respectivamente. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, p<0.05.

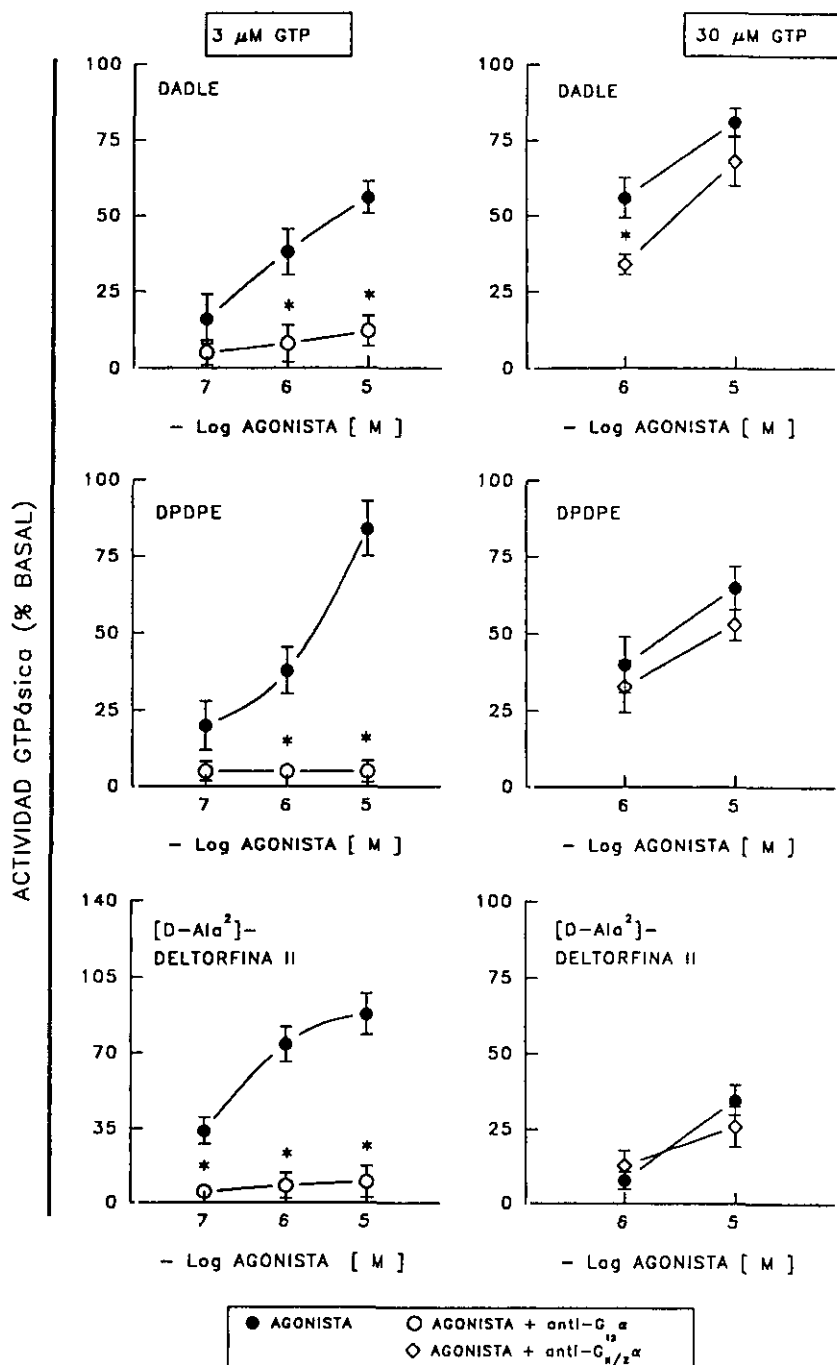


FIGURA 32. Efecto de los antisueros anti-G₁₂α y anti-G_{12/13}α (protocolo 1) sobre la estimulación provocada por los agonistas opioides DADLE, DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II de la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón. Las concentraciones de antisueros empleadas fueron (en μ g/ μ g de proteína) de 0.82 y 0.17 para el anti-G₁₂α y anti-G_{12/13}α, respectivamente. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales, que presentaron una actividad enzimática de 50 ± 5 y de 120 ± 10 pmoles de GTP/ μ g/min para 3 μ M y 30 μ M de concentración de sustrato, respectivamente. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

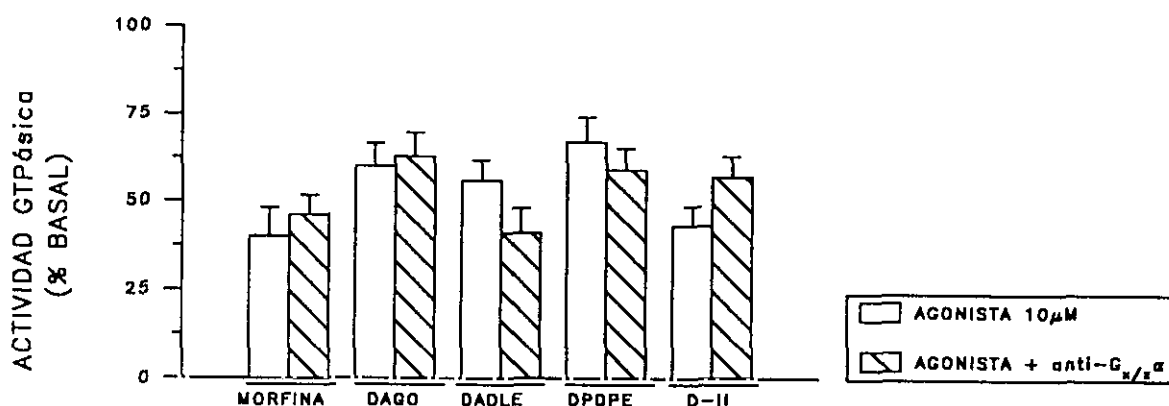


FIGURA 33. Efecto del antisuero anti-G $_{\alpha/\alpha}$ (protocolo 1) sobre la estimulación provocada por distintos agonistas opioides de la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón. La concentración de anti-G $_{\alpha/\alpha}$ fue de 0.17 μ g / μ g de proteína y la de GTP de 3 μ M. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones.

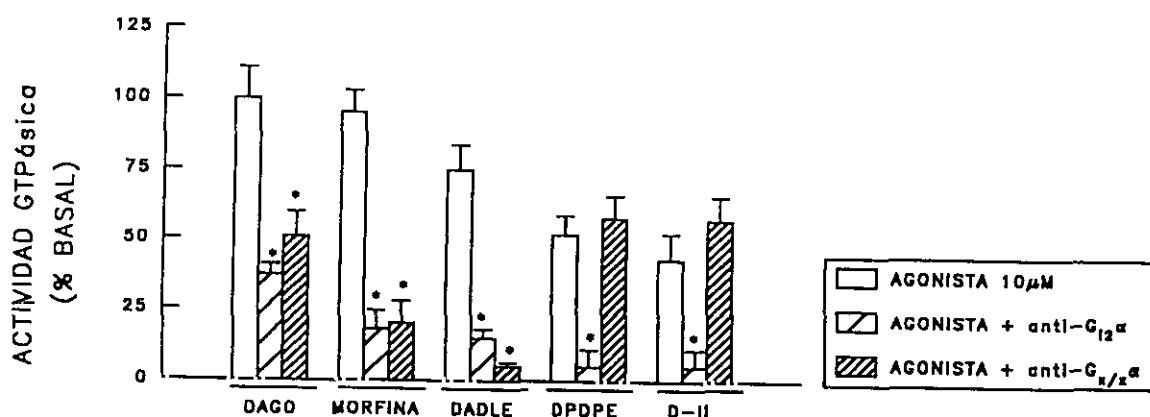


FIGURA 34. Efecto de los antisueros anti-G $_{12\alpha}$ y anti-G $_{\alpha/\alpha}$ (protocolo 2) sobre la estimulación provocada por agonistas opioides de la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón. Las concentraciones de antisueros empleadas fueron (en μ g/ μ g de proteína) de 0.82 y 0.17 para el anti-G $_{12\alpha}$ y anti-G $_{\alpha/\alpha}$, respectivamente, y la de GTP de 3 μ M. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales, definidos como una hidrólisis de GTP de 30 \pm 4 pmoles/mg/min. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$. ([D-Ala 2]-Deltorfin II se ha abreviado como D-II por razones de disponibilidad de espacio).

En el apartado anterior, se describió la carencia de efecto de la NAC sobre la actividad GTPásica de baja Km en el PAG de ratón. Este resultado se produjo al utilizar el protocolo diseñado para estudiar la estimulación de los agonistas (preincubación 2h-4°C), sin embargo, en las condiciones de ensayo óptimas para evidenciar las acciones de los antisueros anti-G α , se detectó un efecto activador de la NAC sobre la hidrólisis de GTP, en torno al 25-75%, dependiendo de la concentración de sustrato presente en el ensayo (**Figura 36**). Utilizando esta misma aproximación experimental, el efecto potenciador de la naloxona sobre la NAC ya observado con el protocolo de preincubación en frío, se ve favorecido. Estos resultados se resumen en la **Figura 36**.

En la **Figura 37** se muestra la actividad GTPásica de baja Km determinada en membranas P₂ de PAG de ratones administrados por vía i.c.v. con los anticuerpos purificados anti-G₁₂ α y anti-G₁₆ α (dilución equivalente 1:1000) tal y como se describió en el apartado 2.4.4. de Materiales y Métodos. Las curvas concentración-efecto realizadas muestran que en los ratones que recibieron suero preimmune, los opioides morfina, DAGO y DADLE produjeron una estimulación concentración-dependiente de la actividad GTPásica de alta afinidad que, además era revertida por el antagonista opioide naloxona (10 μ M). Sin embargo, en animales tratados con los dos antisueros, la estimulación de la GTPasa sensible a opioides se encontró claramente disminuida (**Figura 37**).

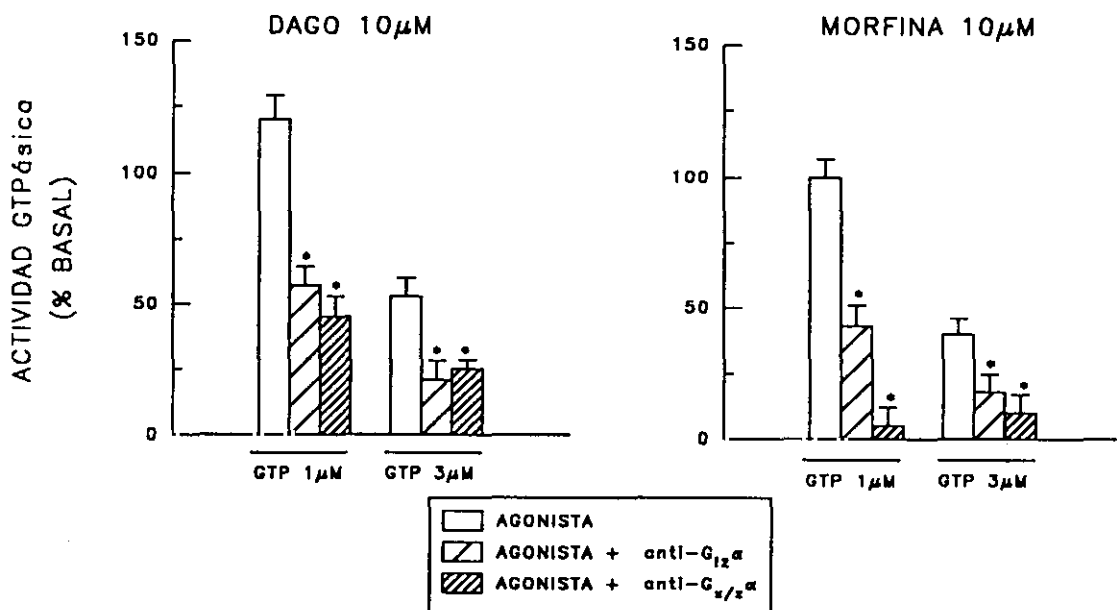


FIGURA 35. Efecto de los antisueros anti-G₁₂α y anti-G_{12/13}α (protocolo 2) en la estimulación provocada por los agonistas opioides DAGO y morfina de la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón. Las concentraciones de antisueros empleadas fueron (en μg/μg de proteína) de 0.82 y 0.17 para el anti-G₁₂α y anti-G_{12/13}α, respectivamente. La actividad enzimática basal era de 34±5 pmoles de GTP/mg/min. Cada valor representa la media±ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, p<0.05.

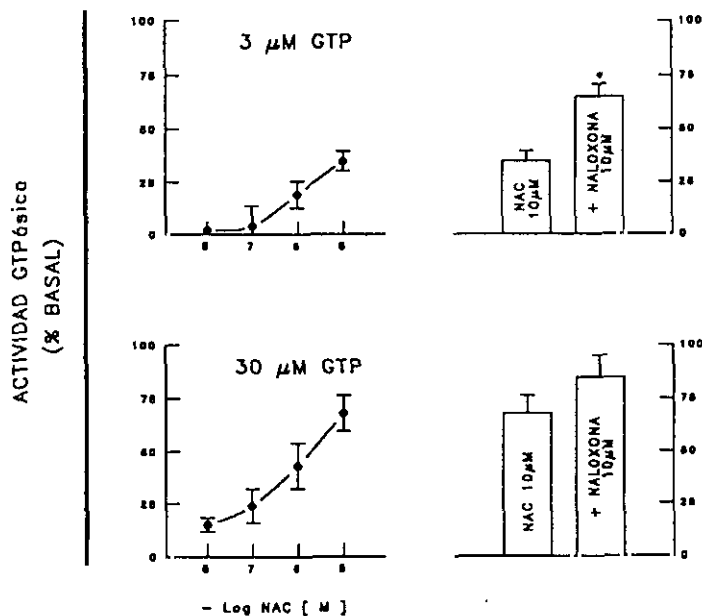


FIGURA 36. Efecto del péptido endógeno N-acetil-β-endorfina (1-31) (NAC) sobre la actividad GTPásica de baja Km en el PAG de ratón. Se han estudiado dos concentraciones de GTP en el protocolo 1. En los diagramas de barras se representa el efecto de la naloxona. Cada valor representa la media±ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, p<0.05.

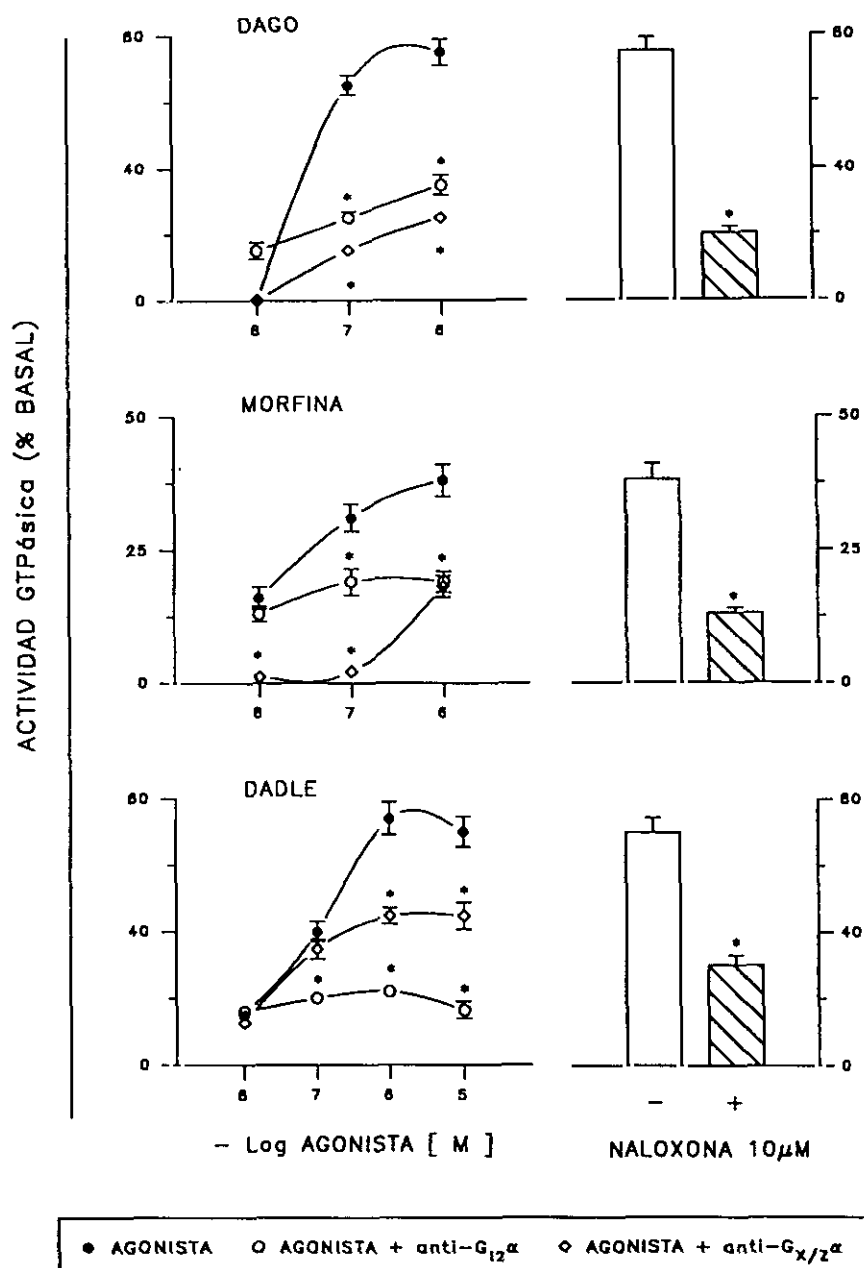


FIGURA 37. Actividad GTPásica de alta afinidad sensible a opioides en el PAG de ratones inyectados 'in vivo' con antisueros anti-G₁₂α y anti-G_{x/za}α. Los antisueros (dilución 1:1000) se inyectaron i.c.v. a los animales 24h antes de su sacrificio. Cada valor representa la media±ESM. * Diferencias significativas con respecto al grupo control (tratado con suero preinmune o en ausencia de naloxona 10 µM). Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, p<0.05.

3.3.2. Modificación de la actividad GTPásica sensible a opioides por antisueros generados frente a los receptores opioides μ y δ

La caracterización de los antisueros empleados en los experimentos que se detallan a continuación está recogida en el apartado 2.2.2. de Materiales y Métodos. Se utilizó en todos los experimentos el protocolo 1. Los sueros preinmunes no modificaron la respuesta GTPásica de las membranas frente a los agonistas empleados.

En la **Figura 38** se muestra el efecto de cantidades crecientes de los antisueros frente al receptor opioide μ (MU/T y MU/2EL) sobre la estimulación de la actividad GTPásica de baja Km provocada por el DAGO y la morfina en el PAG de ratón. Los dos antisueros reducen el efecto estimulador de los agonistas, aunque el MU/T no es capaz de eliminar completamente dicho efecto. La zona frente la que está dirigido este antisuero es la zona amino terminal del receptor opioide μ , que puede presentar diferentes grados de glicosilación lo que podría dificultar la unión del antisuero a algunas isoformas. El MU/2EL, sin embargo, está generado frente a una secuencia del segundo bucle extracelular, por lo que las posibles modificaciones post-translacionales del extremo amino terminal no le afectan. Se eligieron 0.10 μg de antisuero por μg de proteína como relación de trabajo para experimentos posteriores.

Los resultados referentes a los efectos de cantidades crecientes del antisuero frente al receptor opioide δ (anti-RO δ) sobre la estimulación de [D-Ala²]-Deltorfina II en PAG y ME de ratón se presentan en la **Figura 39**, se observa que las dos curvas presentan un perfil muy parecido. Se eligió para las dos estructuras una relación de antisuero de 0.15 μg por μg de proteína.

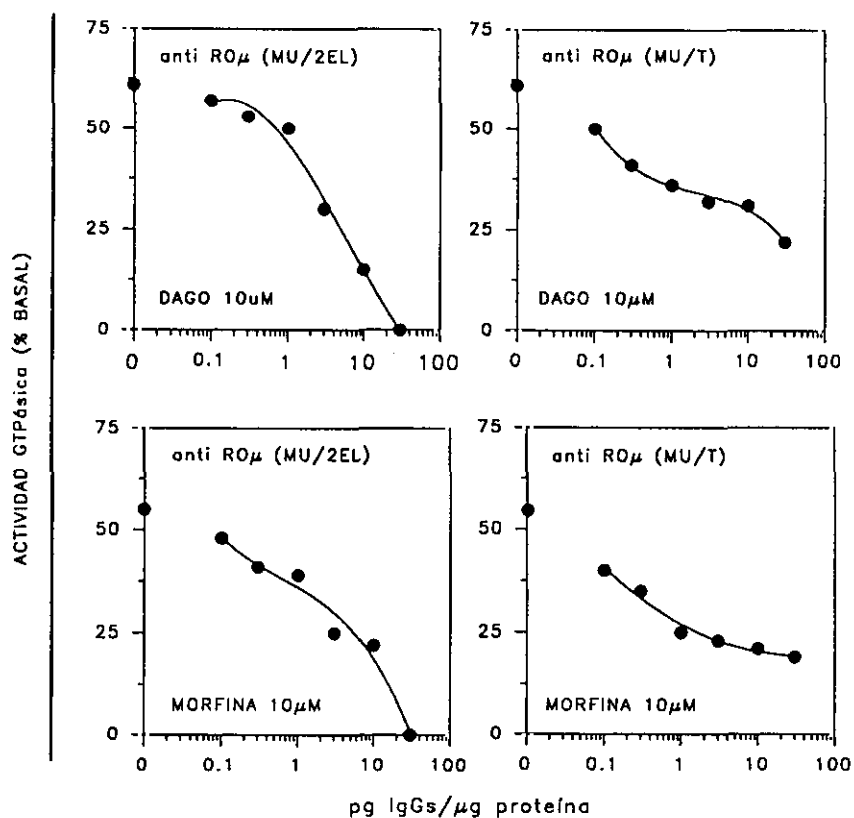


FIGURA 38. Efecto de concentraciones crecientes de los antisueros generados frente al receptor opioide μ (RO μ), MU/T y MU/2EL, sobre la estimulación de la actividad GTPásica de baja Km provocada por DAGO y morfina en membranas de PAG de ratón.

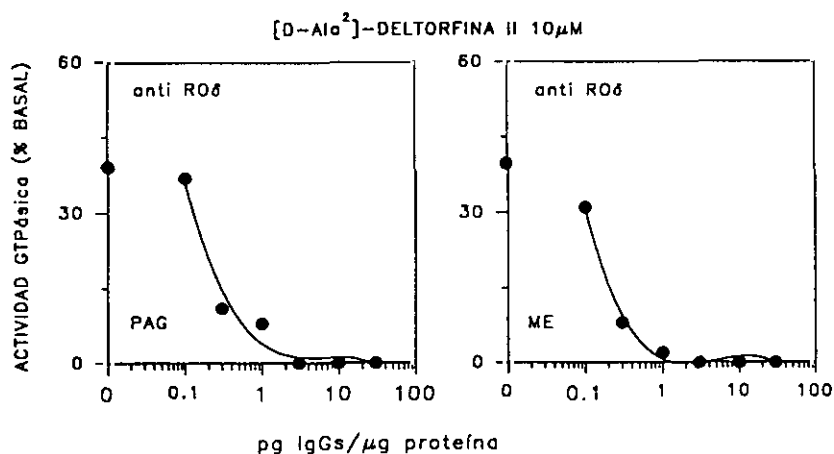


FIGURA 39. Efecto de concentraciones crecientes del antisero generado frente al receptor opioide δ (RO δ) sobre la estimulación de la actividad GTPásica de baja Km provocada por [D-Ala²]-Deltorfina II en membranas de PAG y ME de ratón.

La sensibilidad frente al antisuero (anti-RO δ) de distintos agonistas opioides μ -preferentes se estudió en membranas de PAG de ratón y los resultados están representados en la **Figura 40**. La estimulación GTPásica provocada por el DAGO, la morfina y la β -end no fue sensible a este antisuero aunque el efecto del DADLE se redujo ligeramente en su presencia, sin embargo no se alcanzaron diferencias significativas. Sí que se alcanzó la significación cuando se estudió la sensibilidad de la estimulación GTPásica que agonistas tipo- μ (DAGO y morfina) provocaban en membranas de PAG y ME frente a los antisueros MU/T y MU/2EL (**Figura 41**).

En la **Figura 42** se muestran los resultados relativos al efecto del antisuero anti-RO δ sobre la estimulación provocada por el DPDPE y la [D-Ala²]-Deltorfina II. El efecto de los agonistas selectivos para el receptor δ sobre la actividad GTPásica de membranas de PAG, ME y células NG 108-15, se redujo en membranas incubadas con este antisuero.

En las **Figura 43** se representa el efecto de los antisueros MU/T y MU/2EL frente a los agonistas δ , DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II. Ambos antisueros redujeron el efecto estimulador del DPDPE y la [D-Ala²]-Deltorfina II. En la ME el MU/2EL fue menos efectivo que el MU/T en disminuir la estimulación evocada por ambos agonistas sobre la GTPasa. En el PAG y para la [D-Ala²]-Deltorfina II se observó el patrón contrario. De estos resultados parece desprenderse que en la ME, el receptor μ se encontraría menos glicosilado que en estructuras encefálicas puesto que el antisuero MU/T, generado frente a una secuencia susceptible de sufrir una glicosilación, es más eficaz en bloquear a su antígeno correspondiente.

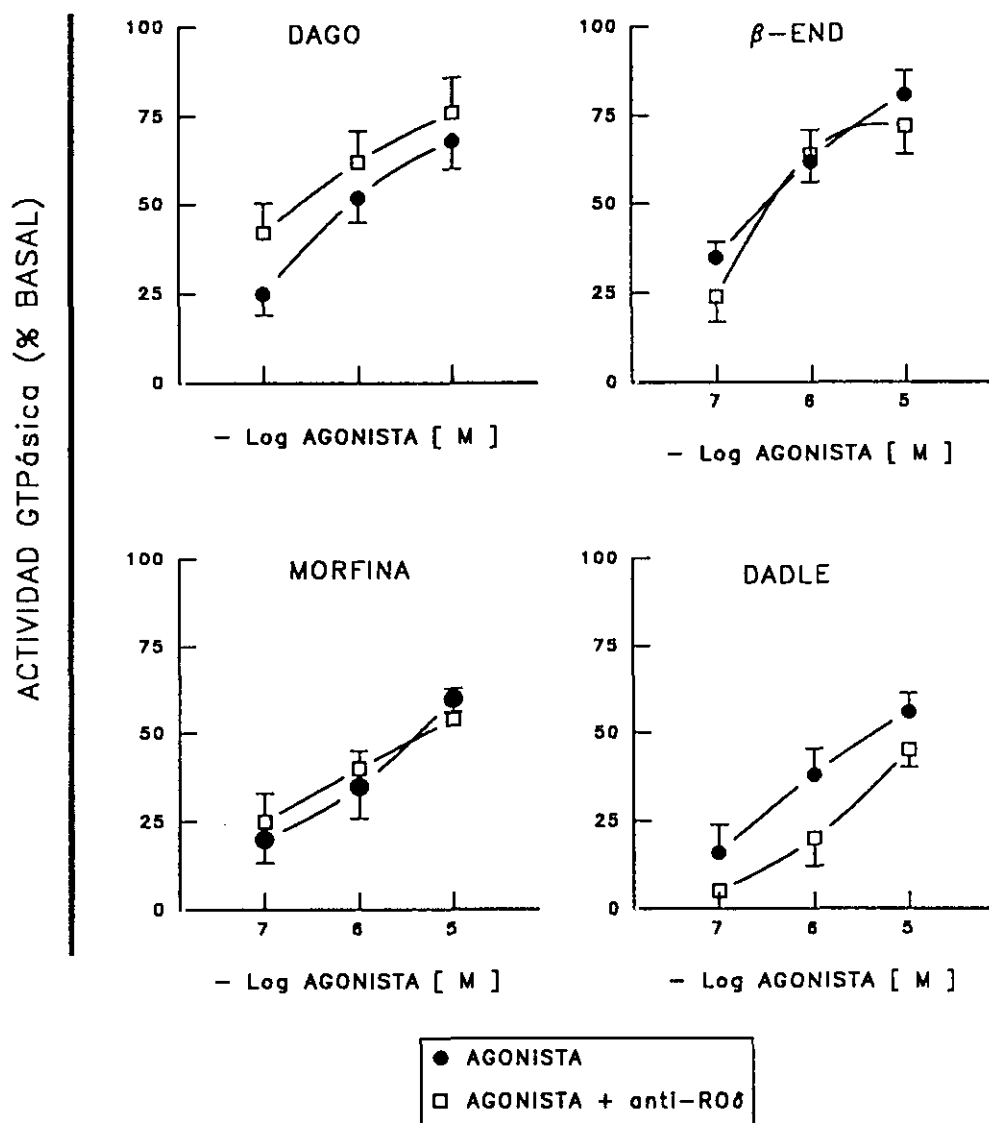


FIGURA 40. Efecto del antisuero anti-RO6 sobre la estimulación de los agonistas opioides DAGO, morfina, β -endorfina (1-31) (β -end) y DADLE de la actividad GTPásica de baja K_m de membranas de PAG de ratón. Las concentración de antisuero presente en el ensayo fue de 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína de membrana. Los datos están expresados en porcentaje de variación con respecto a la actividad basal, que presentó un valor de 63 ± 6 pmoles/mg/min. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones.

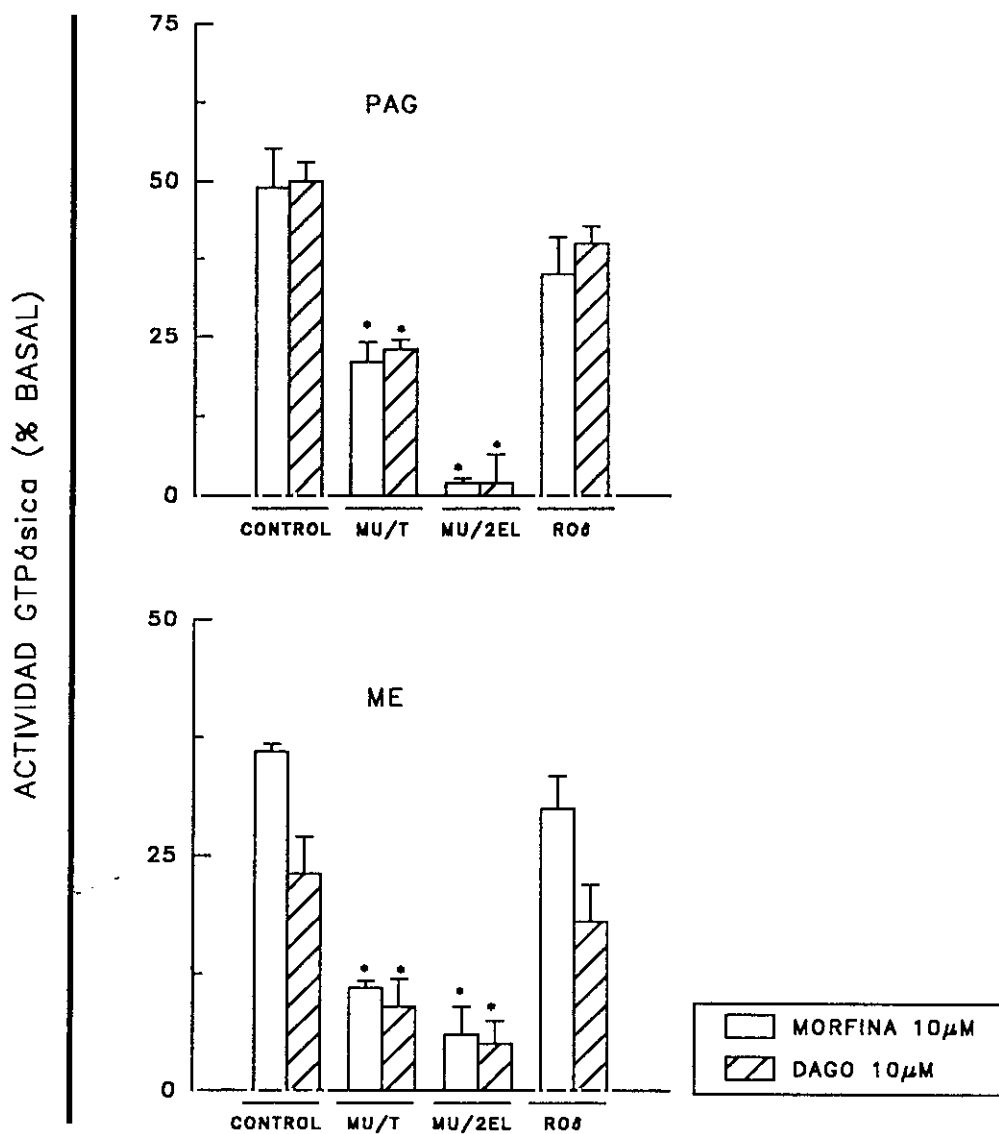


FIGURA 41. Efecto de los antisueros anti-ROp (MU/T y MU/2EL) y del anti-RO6 sobre la estimulación de la actividad GTPásica de baja Km del PAG y la ME de ratón provocada por los agonistas opioides DAGO y morfina. Las concentraciones de antisueros empleadas fueron (en $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína) de 0.10 para el MU/T y el MU/2EL y de 0.15 para el. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en presencia de los agonistas. Los valores basales fueron en el PAG un valor de 54 ± 6 y en la ME de 40 ± 4 pmoles de GTP/mg/min. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

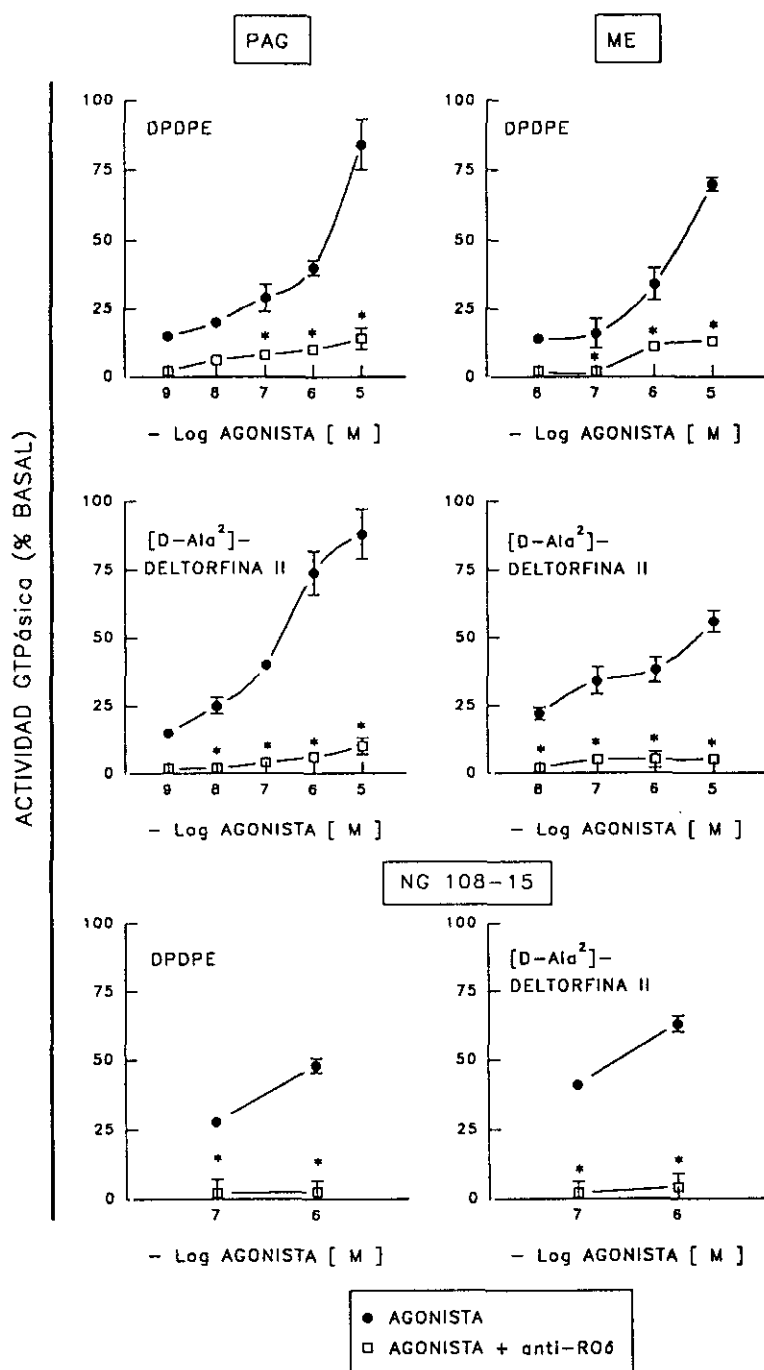


FIGURA 42. Sensibilidad al antisuero anti-RO6 de los efectos estimuladores de los agonistas opioides DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II sobre la actividad GTPásica de baja Km de membranas de PAG y ME de ratón y de células NG 108-15. La concentración de antisuero en el ensayo fue de 0.15 µg/µg de proteína de membrana. Cada valor representa la media±ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en presencia de los agonistas. Los valores basales fueron 54±6, 40±4 y 40±4 pmoles de GTP/mg/min en PAG, ME y células, respectivamente. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, p<0.05.

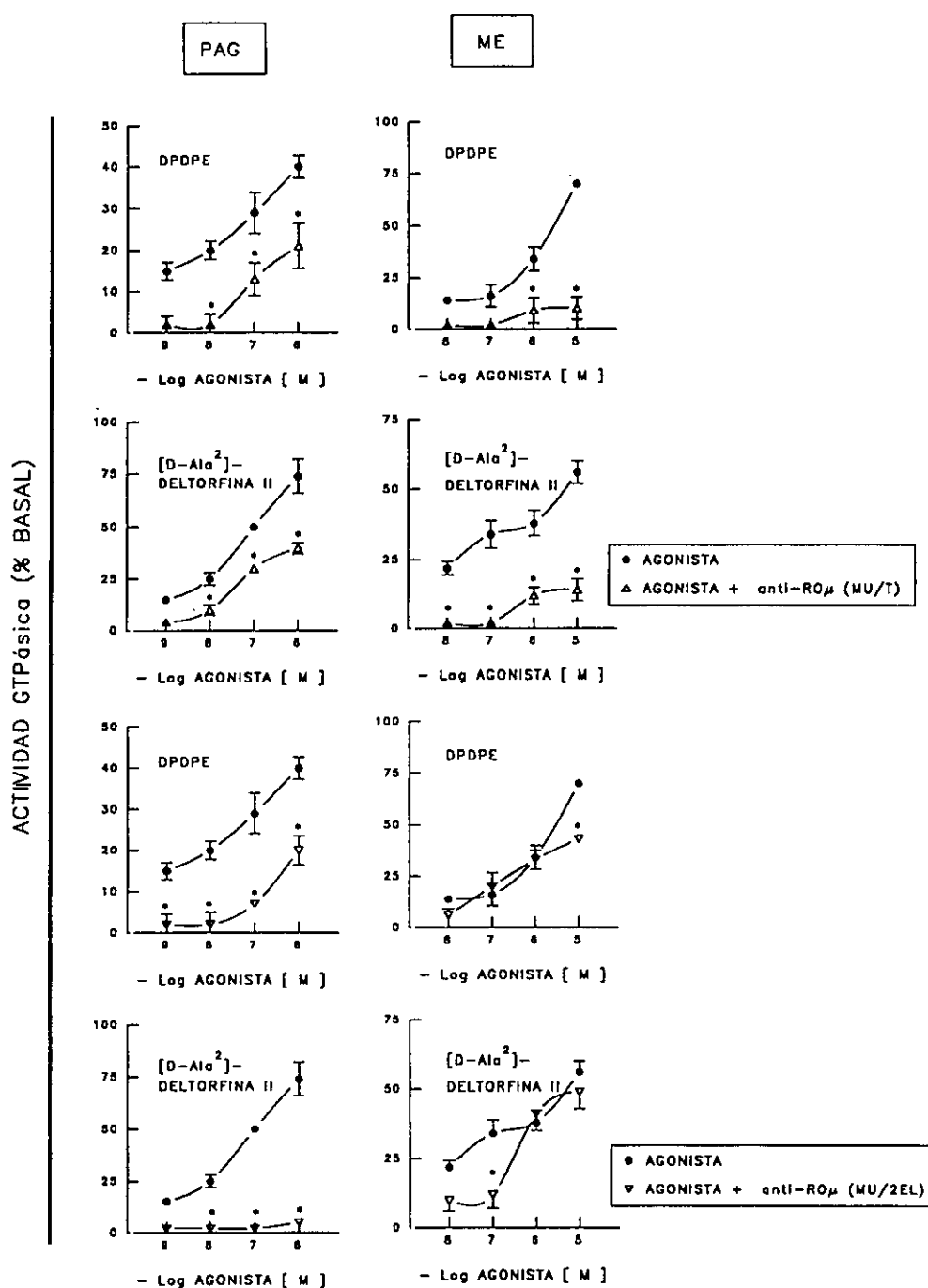


FIGURA 43. Efecto de los antiseros anti-ROp MU/T y MU/2EL sobre la estimulación provocada por los agonistas opioides DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfinina II de la actividad GTPásica de baja Km de membranas de PAG y ME de ratón. La concentración de antisuero en el ensayo fue de 0.10 µg/µg de proteína de membrana. Cada valor representa la media±ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en presencia de los agonistas. Los valores basales fueron de 50±5 y 36±6 pmoles de GTP/mg/min en el PAG y la ME, respectivamente. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

En base a estudios "in vivo" se ha sugerido la participación de de distintos subtipos de receptores δ en la analgesia supraespinal del ratón. El DPDPE sería el agonista selectivo para el subtipo δ_1 y la [D-Ala²]-Deltorfina II para el subtipo δ_2 . La analgesia supraespinal parece estar mediada principalmente por el subtipo δ_1 y la espinal por el subtipo δ_2 (Takemori y Portoghese, 1993). El desarrollo de antagonistas preferenciales para cada uno de los subtipos farmacológicos del receptor δ ha favorecido el desarrollo de esta hipótesis. El antagonista del subtipo δ_1 es el hidrocloreuro de benzilideno-naltrexona (BNTX) (Portoghese y col., 1992) y del subtipo δ_2 es el naltribén metanosulfonato (NTB) (Sofuoglu y col., 1991). El BNTX y el NTB (10 nM y 100 nM) se estudiaron a fin de determinar su efecto sobre la estimulación de la actividad GTPásica provocada por el DPDPE y la [D-Ala²]-Deltorfina II en el PAG y la ME de ratón así como en las células híbridas NG 108-15. Los resultados de estos experimentos se encuentran recogidos en las **Figura 44**.

La estructura nerviosa en la que se manifestó el efecto diferencial de BNTX y NTB fue la ME en la que el BNTX afectó únicamente la estimulación del DPDPE y el NTB a la de [D-Ala²]-Deltorfina II. Por el contrario, en el PAG los dos antagonistas modificaron la respuesta de la GTPasa tanto frente al DPDPE como a la [D-Ala²]-Deltorfina II (ver **Figura 44**).

En las células NG 108-15, el efecto estimulador del DPDPE sólo resultó afectado por el BNTX. Los dos antagonistas redujeron la respuesta de las células a la [D-Ala²]-Deltorfina II, pero el efecto reductor del NTB se manifestó antes (**Figura 45**).

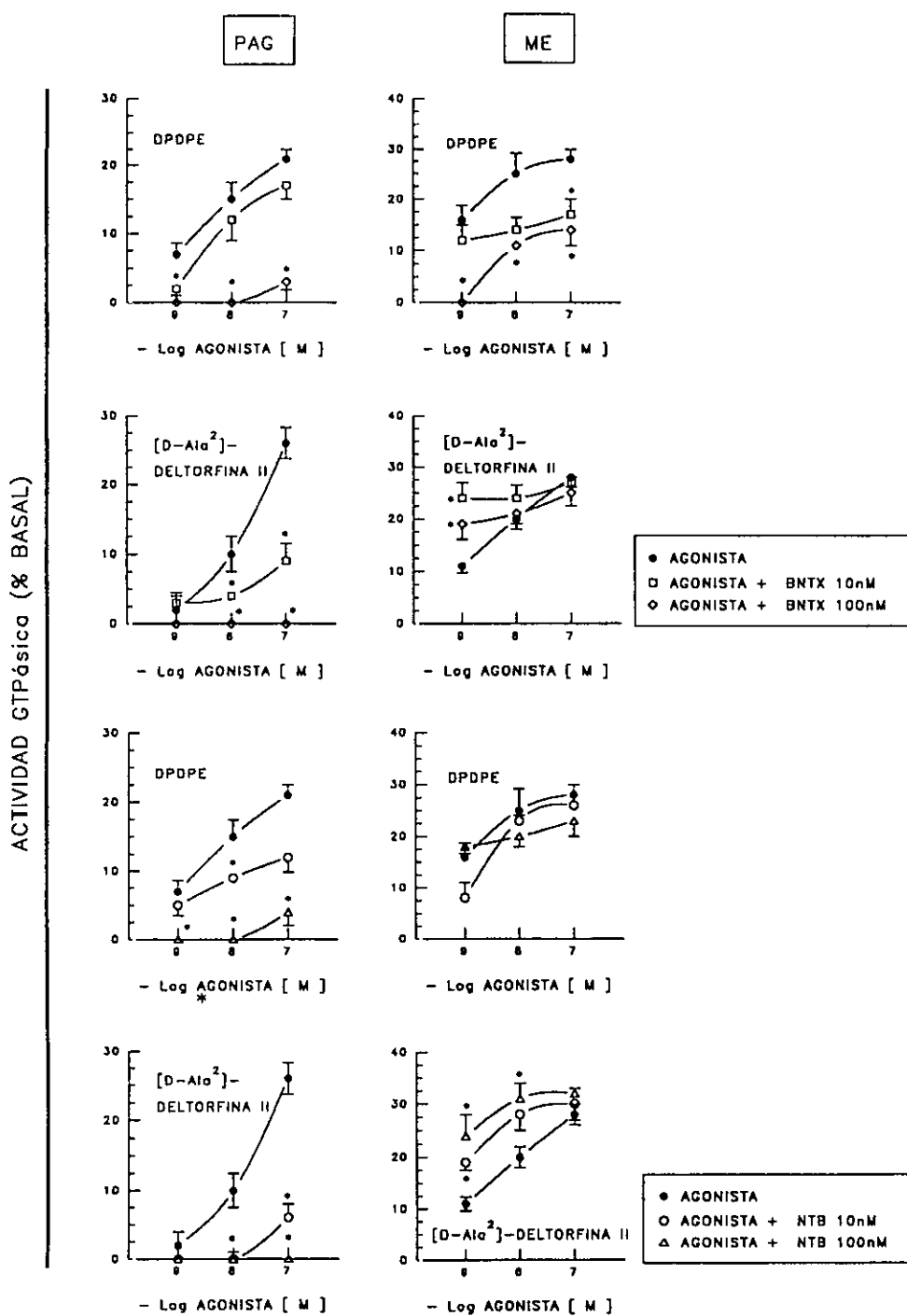


FIGURA 44. Efecto del BNTX y del NTB, antagonistas selectivos de los receptores δ_1 y δ_2 , respectivamente, sobre la estimulación de la actividad GTPásica de baja Km provocada por los agonistas opioides DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II en membranas de PAG y ME de ratón. La actividad GTPásica basal fue de 90 ± 7 y 80 ± 6 pmoles/mg/min en PAG y ME, respectivamente. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en presencia de los agonistas. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

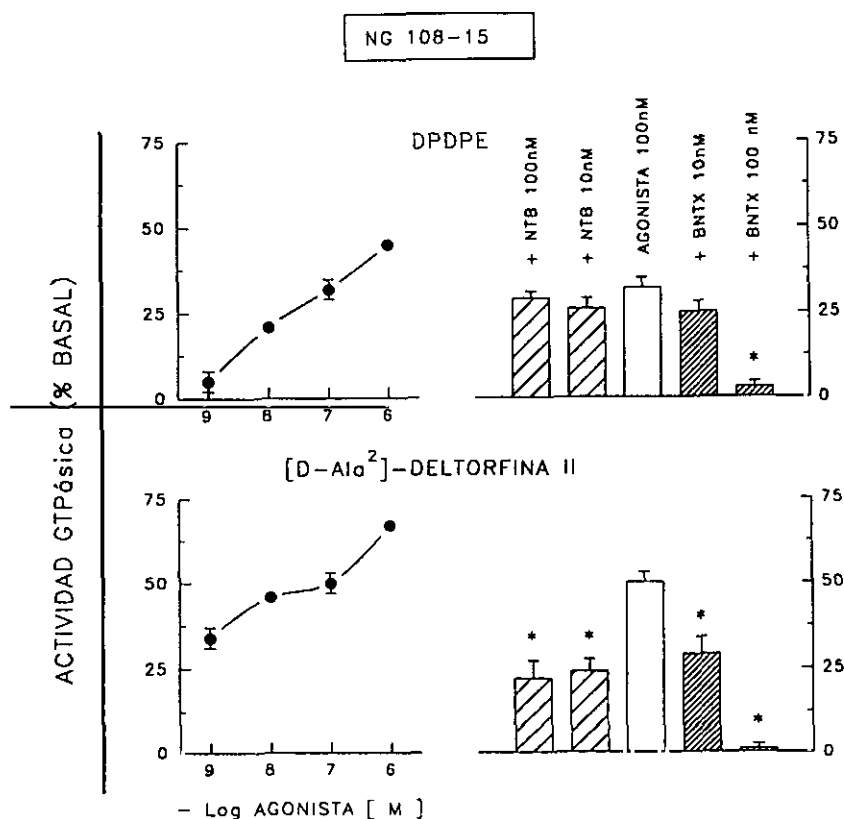


FIGURA 45. Efecto de los antagonistas selectivos del receptor opioide δ , BNTX y NTB, sobre la estimulación de la actividad GTPásica de baja Km provocada por los agonistas opioides DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II en células híbridas NG 108-15. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores basales obtenidos en presencia de los agonistas, siendo los basales de 70 ± 7 pmoles de GTP/mg/min. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

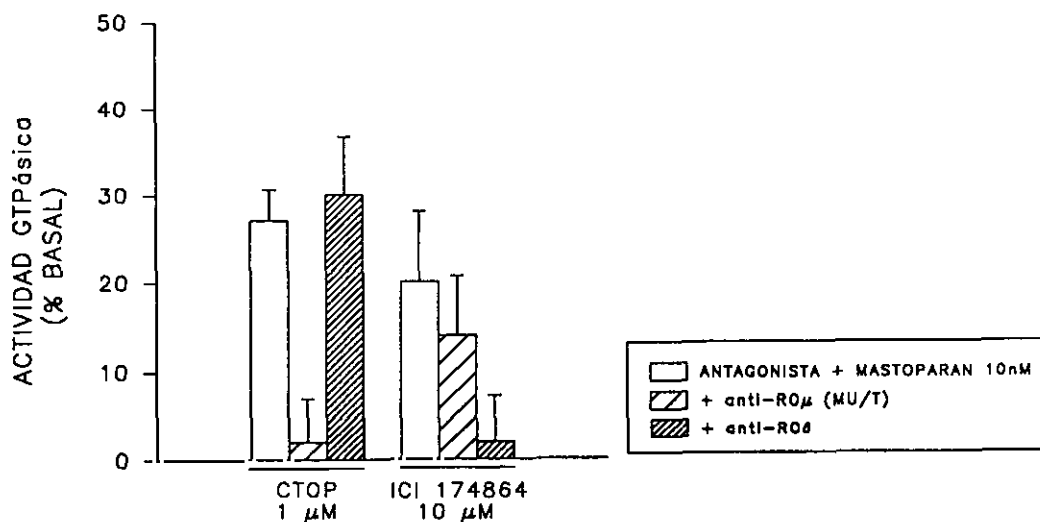


FIGURA 47. Efecto de los antiseros anti-RO μ (MU/T) y anti-RO δ en el protocolo 1 sobre la estimulación de la actividad GTPásica de baja Km provocada por la combinación de los antagonistas CTOP o ICI 174864 (1 μ M) y mastoparan 10 nM en el PAG de ratón. Las concentraciones de antiseros empleadas fueron (en μ g/ μ g de proteína de membrana) de 0.11 y 0.15 para MU/T y, respectivamente; y la actividad basal presentó un valor de 50 ± 6 pmoles de GTP/mg/min.

3.4. Efecto del péptido mastoparén sobre la actividad GTPásica

Estos experimentos se realizaron en membranas P₂ con de PAG de ratón y, salvo que se señale lo contrario, se utilizó el protocolo de preincubación en frío (2h a 4°C). El componente de baja afinidad se definió con GTP 1 mM y se sustrajo de la hidrólisis de GTP observada en presencia de una concentración de sustrato de 3 μ M.

La incubación de las membranas con el péptido mastoparén provoca una estimulación concentración-dependiente de la actividad GTPásica de baja K_m (**Figura 46, panel A**). Los valores de la actividad enzimática se incrementaron entre 1.3 y 1.7 veces al incubar las membranas con concentraciones de mastoparén de 1 y 10 μ M, respectivamente. El antagonista selectivo de los receptores μ , CTOP, carece de efecto sobre la GTPasa del PAG de ratón, pero cuando se incubaba a una concentración de 1 μ M con el mastoparén se potencia el efecto del péptido sobre la reacción enzimática. En estas condiciones, prácticamente se duplica el efecto del mastoparén de modo que concentraciones en el rango nanomolar del péptido (10-100 nM) incrementan la actividad basal de la enzima entre 1.3 y 1.7 veces, respectivamente (**Figura 46, panel A**).

Utilizando esta aproximación experimental, se estudió también el efecto de una serie de antagonistas de distintos receptores celulares. Los antagonistas empleados fueron la naloxona (antagonista opioide no selectivo), el CTOP (antagonista selectivo de los receptores opioides μ), el ICI 174864 (antagonista selectivo de los receptores opioides δ), el nor-BNI (nor-binaltorfimina, antagonista selectivo de los receptores opioides K), el sulpiride (antagonista de los receptores D₂-dopaminérgicos), el idazoxán (antagonista de los receptores α_2 -adrenérgicos), y la bicuculina (antagonista de los receptores GABA_A). Las concentraciones mayores de estos antagonistas produjeron un pequeño incremento sobre la actividad basal de la enzima, sin embargo, no se detectaron cambios estadísticos de carácter significativo (**Figura 46**).

Se realizaron curvas concentración-respuesta en las que se estudió el efecto que presentaba sobre la actividad GTPásica de alta afinidad la combinación de concentraciones crecientes de los antagonistas con una concentración subefectiva de mastoparén (10 nM). Se detectaron incrementos sobre la basal (1.5–1.8 veces) al combinar el mastoparén 10 nM con la naloxona, el CTOP, el ICI 174864, el sulpiride, el idazoxán o la bicuculina (1–100 μ M) (**Figura 46**). Este último compuesto, antagonista de los receptores GABA_A (no regulados por proteínas G) no alteró la respuesta del mastoparén sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón.

Con objeto de determinar la posible participación de los receptores opioides en los efectos potenciadores de los antagonistas opioides sobre el mastoparén, se estudió el efecto de los antisueros MU/T y anti-RO δ generados frente a los receptores opioides μ y δ siguiendo el protocolo 1. Los resultados se muestran en la **Figura 47**. Se apreció una ligera disminución de la potenciación mastoparén-antagonista por los antisueros, aunque no se alcanzó la significación estadística. En este punto habría que señalar que los antisueros generados frente a los extremos amino terminales de los antígenos no pueden obviar la entrada de los ligandos (en este caso de los antagonistas) aunque sí disminuir su K_d.

La presencia en el ensayo de los opioides DAGO, morfina o DPDPE (1 μ M) previno la potenciación que la naloxona ejercía sobre el efecto del mastoparén (**Figura 48**). Los tres agonistas aumentaron la liberación de ³²Pi por la enzima y su efecto fue antagonizado por las dos concentraciones de naloxona empleadas (1–10 μ M).

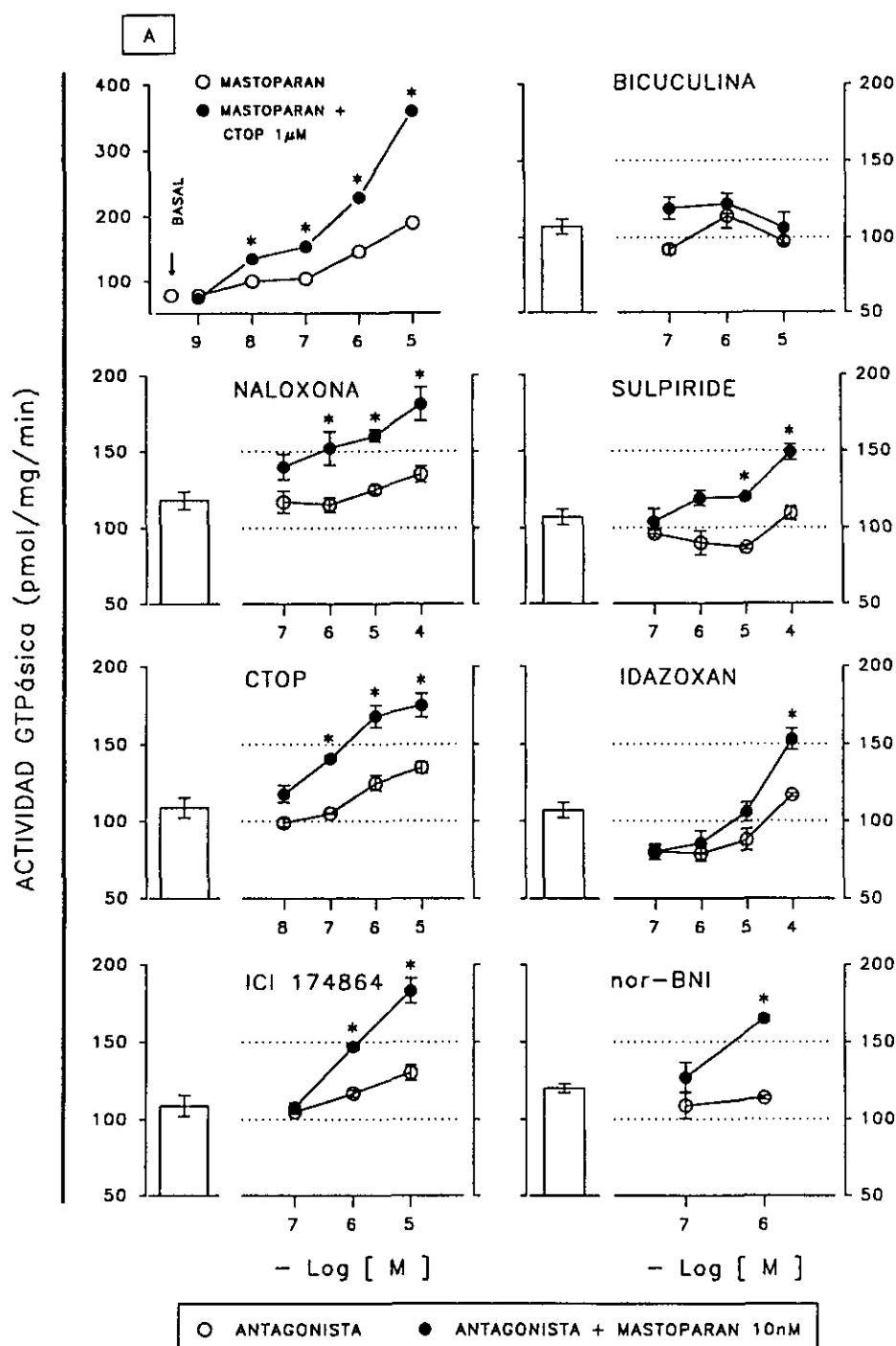


FIGURA 46. Panel A: Efecto estimulador del mastoparén sobre la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón en ausencia (○) o en presencia (●) de CTOP 1 μ M. La flecha indica la actividad enzimática basal. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 4 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto al grupo incubado sólo con mastoparén. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$. En el resto de las gráficas se muestra el efecto de naloxona, CTOP, ICI 174864, sulpiride, idazoxán, nor-BNI y bicuculina en combinación con mastoparén 10 nM. Las barras indican la actividad GTPásica en presencia de mastoparén 10 nM. * Diferencias significativas con respecto a la actividad de la enzima observada en presencia únicamente de antagonista. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

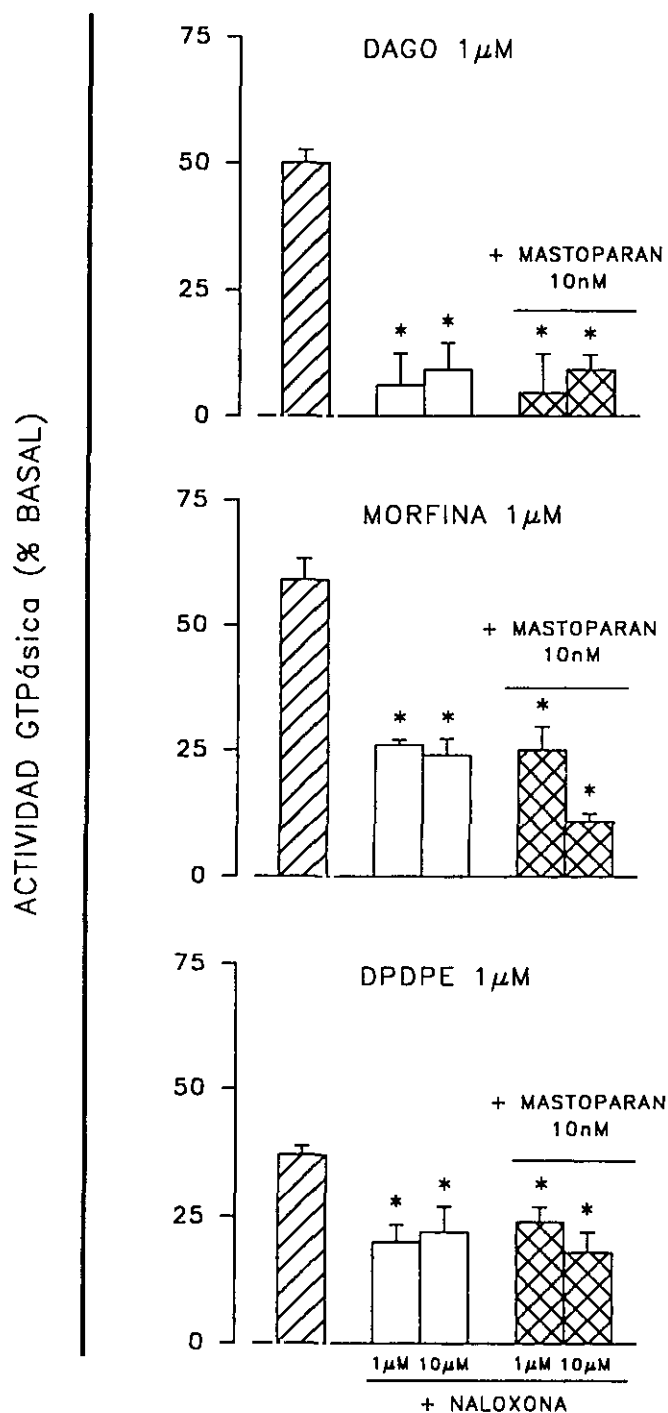


FIGURA 48. Efecto de la combinación de mastoparén y naloxona sobre la actividad GTPásica de baja K_m del PAG de ratón en presencia de los agonistas opioides DAGO, morfina o DPDPE. Los valores están expresados en porcentaje de variación con respecto a la actividad basal de la enzima (105 ± 7 pmoles de GTP/ng/min). Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 4 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a la actividad de la enzima observada en presencia únicamente de agonista. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

Se realizó una curva con concentraciones crecientes de GTP y una concentración fija del mastoparén para determinar qué concentración de sustrato era la más apropiada para determinar el efecto estimulador del péptido. Los resultados mostraron que concentraciones micromolares eran las óptimas (**Figura 49**). Utilizando una concentración de GTP 3 μ M el mastoparén presentó un efecto estimulador algo menor que con el protocolo de preincubación en frío (75% y 100% sobre la basal, respectivamente) pero a concentraciones mayores de GTP (30 μ M) se obtuvieron los mismos resultados (en torno al 100% en ambos casos) (**Figura 49**).

El mastoparén y la NAC presentan ciertas semejanzas en su comportamiento: i) la naloxona modifica el efecto de ambos agentes y, ii) los dos modifican la eficacia antinociceptiva que los opioides administrados por vía i.c.v. provocan en el ratón. En este último punto hay que señalar que el efecto bloqueante del mastoparén sobre la antinocicepción opioide en el ratón puede evitarse con la administración previa de NAC, también i.c.v., (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1995b; Sánchez-Blázquez y col., 1994). Todo ello implica un mecanismo común de actuación para los dos péptidos.

Para determinar si en estos comportamientos participaban los mismos mecanismos, se emplearon los dos péptidos en una serie de experimentos en los que se estudió el efecto de la combinación de concentraciones crecientes de uno u otro con concentraciones fijas del otro. En ningún caso la respuesta de la actividad GTPásica frente a la NAC se vió modificada por la presencia de concentraciones no efectivas de mastoparén (10 nM) y, por el contrario, vió desplazada completamente su curva en presencia de concentraciones estimuladoras de mastoparén (1 μ M) (**Figura 50**). La curva del mastoparén tampoco se vió modificada por la presencia en el ensayo de concentraciones picomolares de NAC, sin embargo, cuando las concentraciones de NAC fueron cercanas a la concentración micromolar, la curva se desplazó a la izquierda con respecto a la control llegándose a alcanzar diferencias significativas, lo que indica que la presencia de NAC aumentó la eficacia del mastoparén sobre la GTPasa (**Figura 51**).

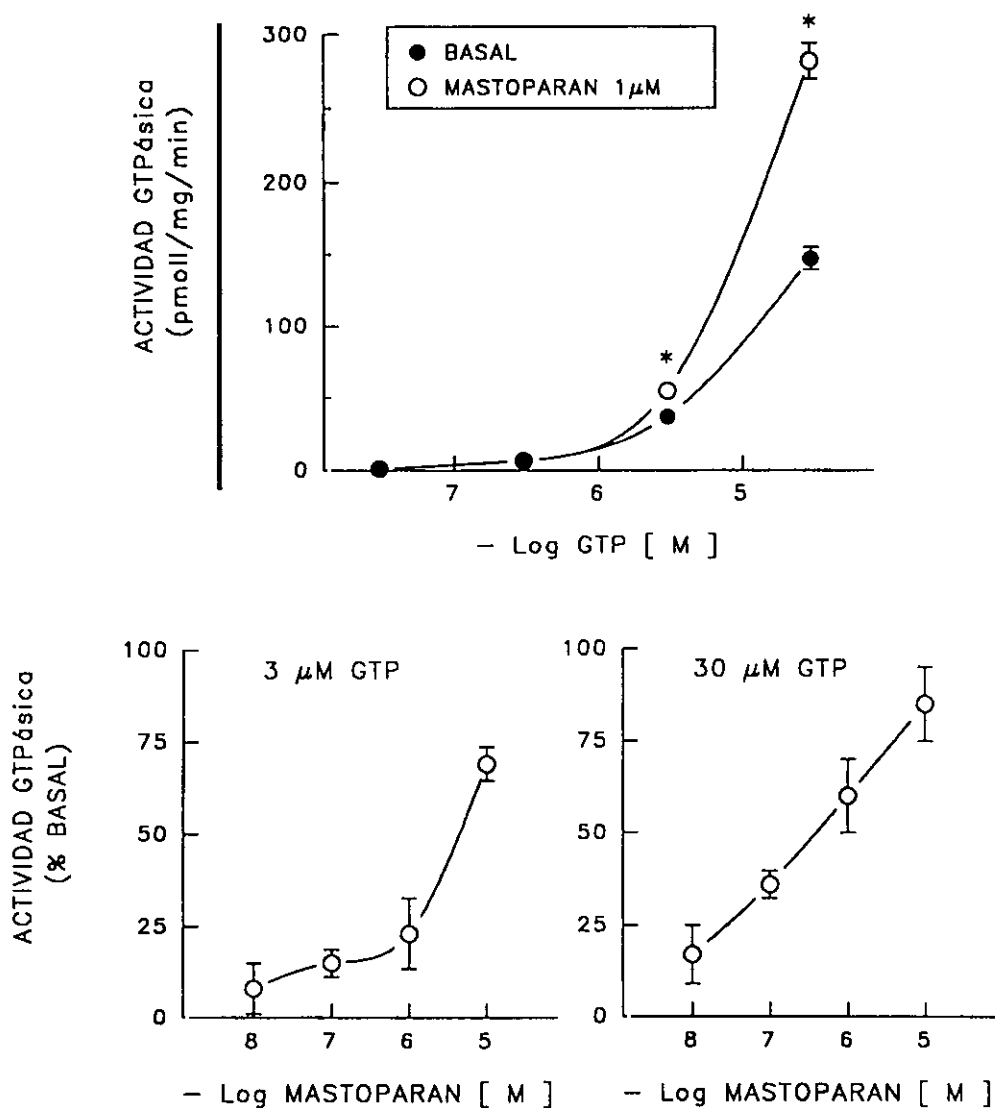


FIGURA 49. Panel superior: Influencia de la concentración de GTP en el efecto del péptido mastoparán en el protocolo 1 sobre la estimulación de la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón. Cada valor representa la media±ESM de al menos 3 determinaciones. En las gráficas inferiores se muestra la estimulación de la actividad GTPásica de baja Km en el PAG de ratón por el péptido mastoparán a dos concentraciones de GTP en el mismo protocolo.

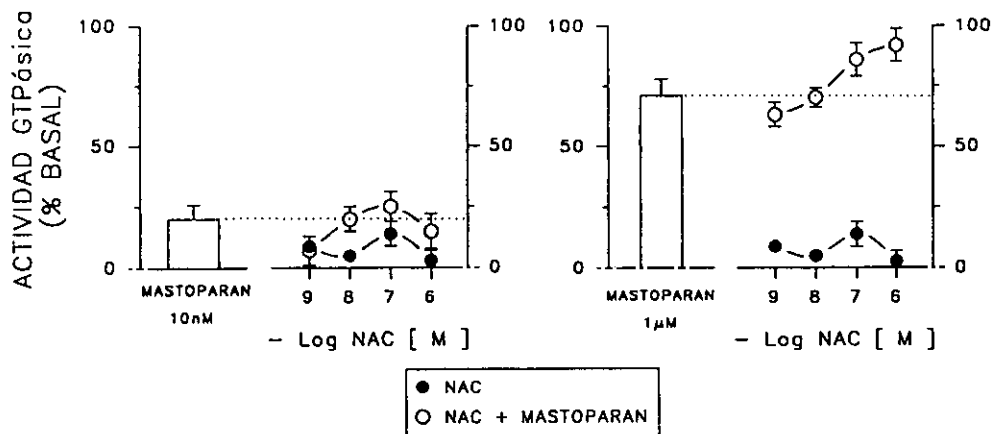


FIGURA 50. Efecto de la combinación del péptido opioide endógeno N-acetil-β-endorfina (1-31) (NAC) con dos concentraciones de mastoparan sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón, definida por una actividad basal de 75 ± 7 pmoles de GTP/mg/min. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones.

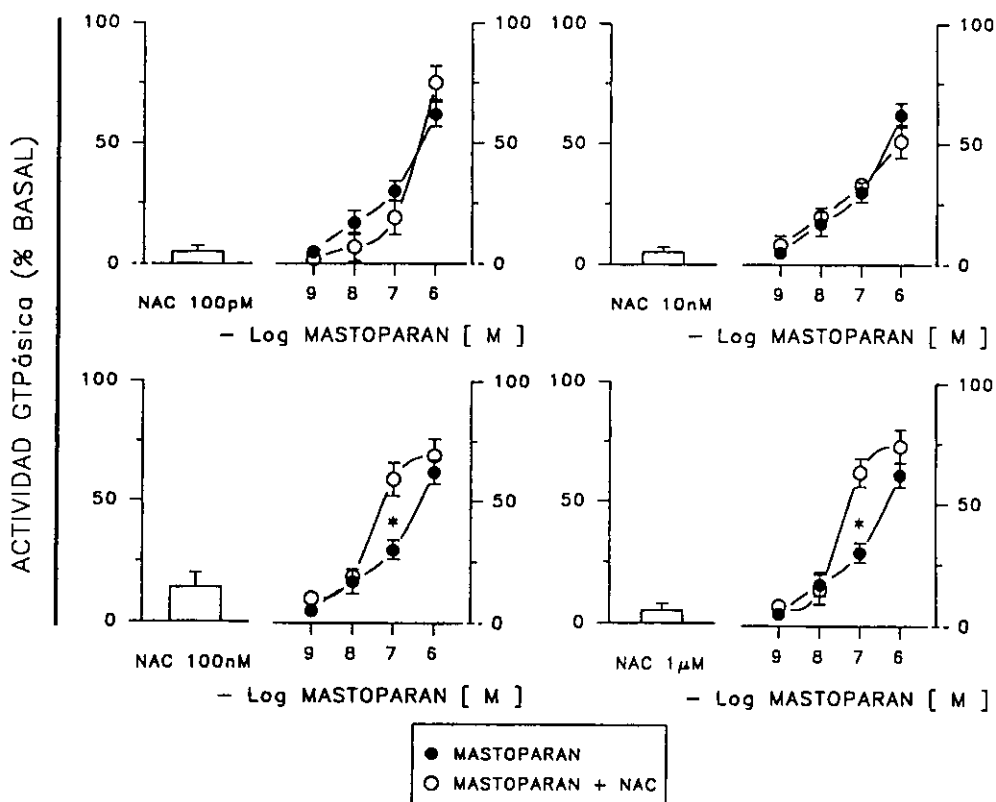


FIGURA 51. Efecto de la combinación del mastoparan con distintas concentraciones del péptido opioide endógeno N-acetil-β-endorfina (1-31) (NAC) sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón, definida por una actividad basal de 75 ± 7 pmoles de GTP/mg/min. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores de las curvas en ausencia de NAC. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

En la **Figura 52** también se muestran curvas concentración-respuesta en las que se estudia la influencia de distintas concentraciones de mastoparén sobre la estimulación GTPásica promovida por la β -end en el PAG de ratón. Cuando se introdujeron en el ensayo concentraciones subefectivas de mastoparén, la respuesta de las membranas a la β -end resultó ser menor a la de la situación control (determinada en presencia de β -end únicamente). En todos los casos, sin embargo, se observó un efecto sumatorio de los dos péptidos sobre la actividad enzimática. Este comportamiento fue idéntico cuando se ensayaron los agonistas opioides DAGO, morfina, DADLE y DPDPE (**Figura 53**).

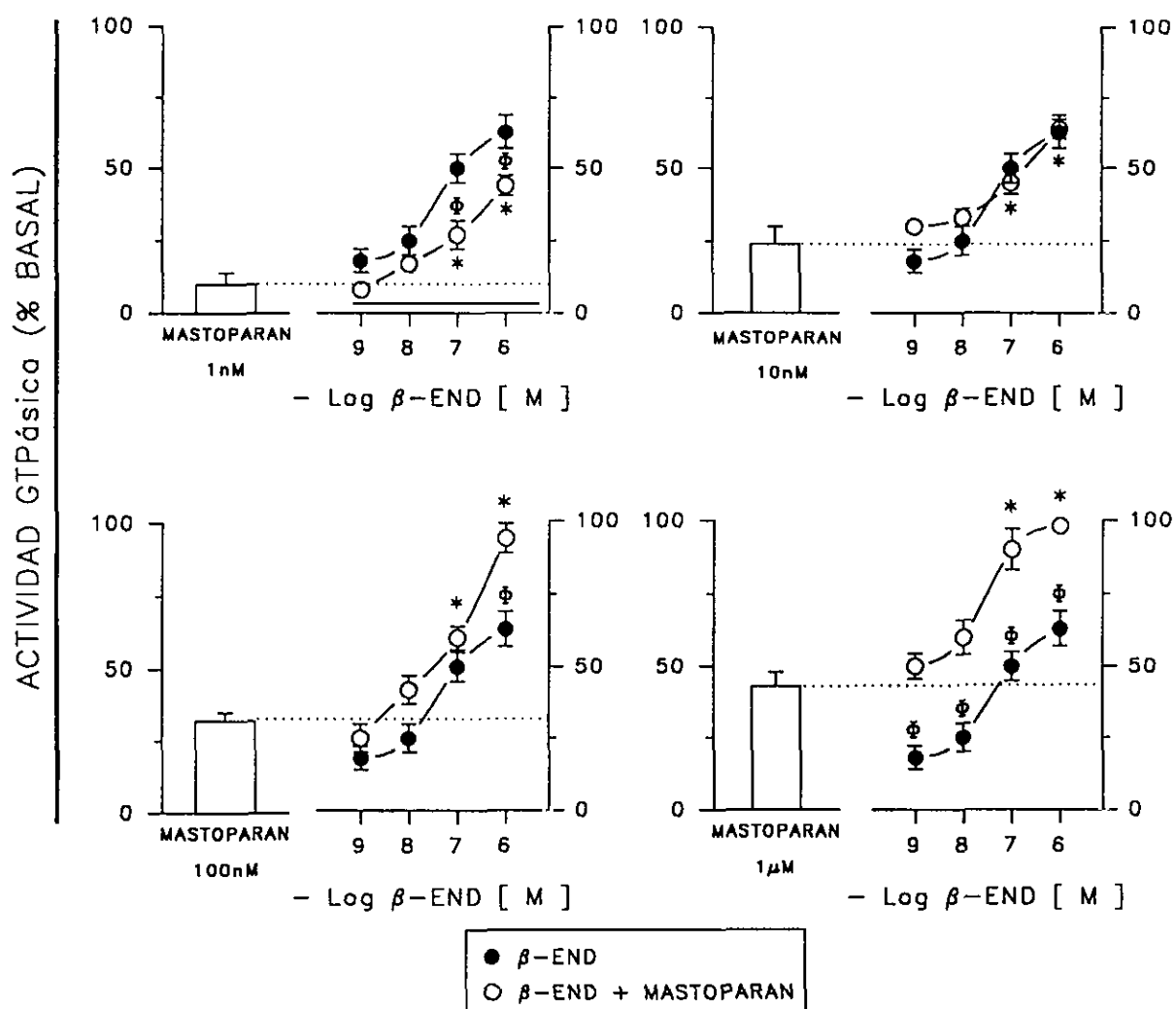


FIGURA 52. Efecto de la combinación del péptido opioide endógeno β -endorfina (1-31) (β -end) y distintas concentraciones de mastoparán sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón, definida por una actividad basal de 80 ± 4 pmoles de GTP/mg/min. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones. * Diferencias significativas con respecto a los valores de las curvas realizadas sólo con β -end. † Diferencias significativas con respecto a la estimulación de la GTPasa provocada por el mastoparán únicamente. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

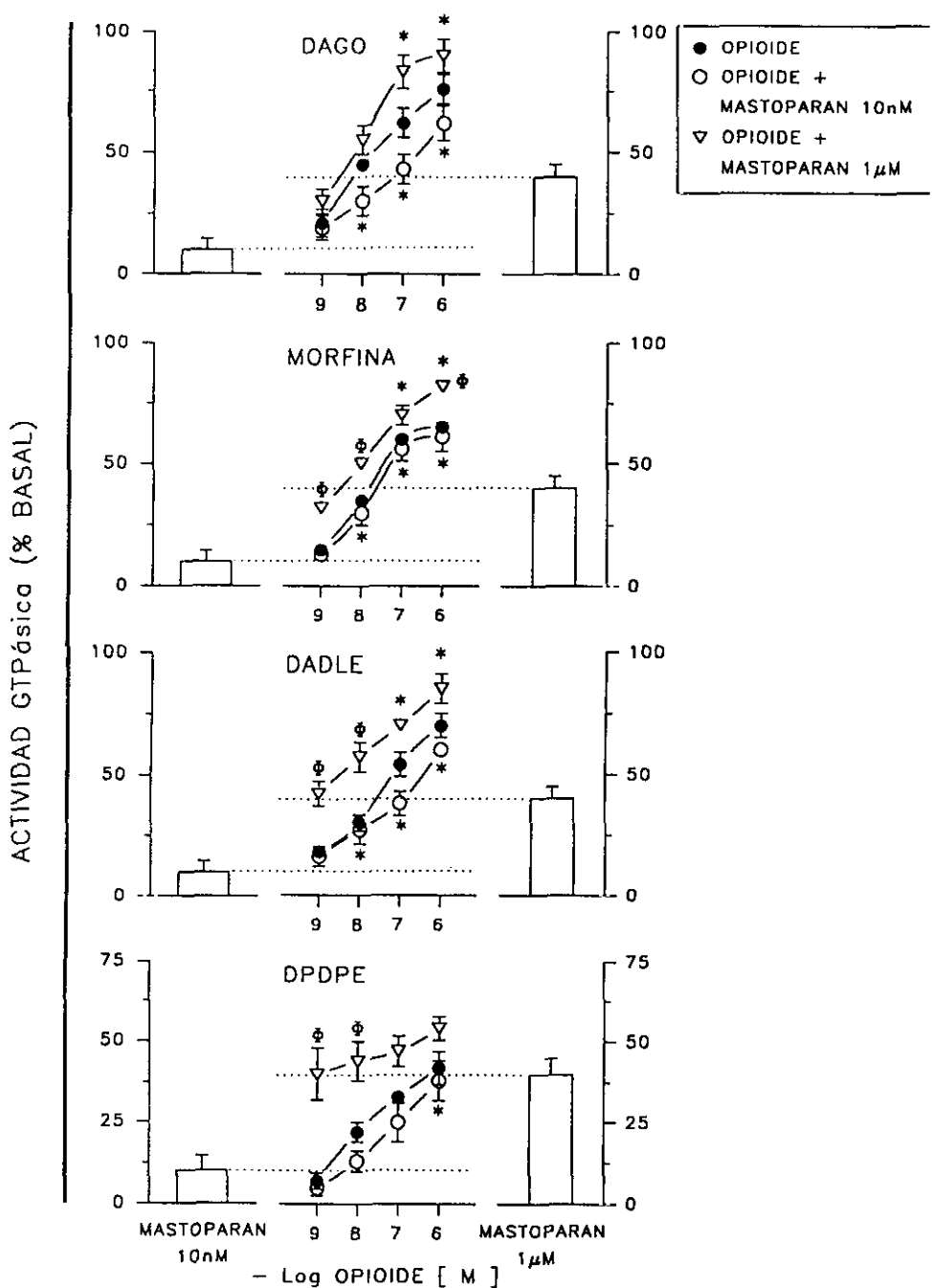


FIGURA 53. Efecto de la combinación de los agonistas opioides DAGO, morfina, DADLE y DPDPE y dos concentraciones de mastoparán sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón, definida por una actividad basal de 85 ± 4 pmoles de GTP/mg/min. Cada valor representa la media \pm ESM de al menos 5 determinaciones. ♦ Diferencias significativas con respecto a los valores de las curvas realizadas sólo con los agonistas. * Diferencias significativas con respecto a la estimulación de la GTPasa provocada únicamente por las distintas concentraciones de mastoparán. * Diferencias significativas con respecto a la estimulación provocada por el mastoparán. Análisis de varianza seguido del test de Newman-Keuls, $p < 0.05$.

DISCUSSION

En este trabajo se ha abordado el estudio de un fenómeno de tanta relevancia social como es la tolerancia-dependencia a opiodes. En concreto, se ha intentado profundizar en dos aspectos de gran actualidad, i) los procesos adaptativos que los tratamientos crónicos provocan en el sistema opioide endógeno y, ii) el sistema de transducción asociado a los receptores opioides, recientemente clonados. Se han empleado dos aproximaciones experimentales: un método cuantitativo clásico como es el radioinmunoensayo, para determinar la evolución en el contenido de los péptidos opioides endógenos β -endorfina (1-31) (β -end) y su derivado "N-acetilado, tras un tratamiento crónico con morfina, en el SNC de las dos especies que con más frecuencia se emplean en farmacología y; una técnica radioenzimática que se ha revelado muy útil para estudiar los fenómenos que se producen inmediatamente a continuación de la unión de un ligando a su receptor, la determinación de la actividad GTPásica de alta afinidad en el SNC del ratón.

1. Cambios en el contenido de β -endorfina (1-31) y N-acetil- β -endorfina (1-31) en el SNC e hipófisis de la rata y el ratón tras la administración crónica de morfina

La β -end, péptido endógeno de 31 aminoácidos que contiene en sus 5 primeros residuos la secuencia de la met-enkefalina, se genera por fraccionamiento enzimático post-translacional a partir del polipéptido precursor pro-opiomelanocortina (POMC). Este precursor se localiza mayoritariamente en los lóbulos de la hipófisis, especialmente en el neurointermedio, y en dos grupos distintos de células en el encéfalo. Uno de estos grupos está localizado en el núcleo arcuado hipotalámico y el otro grupo de células se encuentra en el núcleo del tracto solitario. Con posterioridad, la β -end puede sufrir otras modificaciones enzimáticas, como proteólisis en el extremo carboxilo terminal o acetilaciones en el extremo amino terminal, que suponen grandes cambios en la actividad biológica del péptido. Así por ejemplo, la acetilación del extremo amino terminal reduce drásticamente su capacidad de unirse a los receptores opioides μ y δ , y por tanto, elimina su potente efecto analgésico (Smyth y col., 1979; Deakin y col., 1980). El procesamiento post-translacional comienza en el aparato de Golgi y continúa

en las vesículas de secreción. Esto sugiere que los péptidos derivados de la POMC son almacenados en los gránulos de secreción liberándose simultáneamente (Glembotski, 1981, 1982; O'Donohue, 1983).

La actividad de la acetiltransferasa es de vital importancia en el control de la actividad biológica de los productos de secreción. De hecho, parece que la biosíntesis de la POMC y la actividad acetiltransferasa se encuentran correguladas (Millington y col., 1986). La capacidad de las células POMC para secretar péptidos con distinta actividad biológica podría ser importante en la adaptación de los organismos frente a cambios en el medio ambiente. La acetilación del extremo amino terminal puede ser, i) un proceso metabólico importante de inactivación para regular la actividad opioide en el SNC (Deakin y col., 1980; Smyth y col., 1979; Zakarian y Smyth, 1979); ii) una forma de transporte de β -end inactiva en el plasma, lo que implicaría la existencia en el lugar de destino de una enzima, hasta el momento no aislada, y cuya función sería la eliminación del grupo acetilo protector localizado en la tirosina del extremo amino terminal y; iii) un mecanismo de generación de formas moleculares sin actividad opioide pero con actividad biológica a partir del péptido multiseñal β -end (Akil y col., 1984; Wiegant y col., 1983). En este sentido, se ha descrito recientemente que la N-acetil- β -endorfina (1-31) (NAC) estimula la secreción de prolactina por los mamotropos lo que implica a este neuropéptido en funciones paracrinas, al menos dentro de la hipófisis (Ellerkmann y col., 1993).

El tratamiento crónico (tanto continuo como intermitente) de un opioide produce tolerancia, que se caracteriza por una menor respuesta a la sustancia, y dependencia física, que se asocia con la aparición de alteraciones comportamentales cuando deja de administrarse. Son respuestas adaptativas fisiológicas que suponen una reacción del organismo para contrarrestar los efectos perjudiciales del tratamiento y que intentan recuperar la función inicial. El estudio de los cambios fisiológicos que se producen en el organismo tras la administración crónica de opioides, incluyendo los que afectan al sistema opioide endógeno, es de especial relevancia a causa de la incidencia negativa de estos fenómenos en la

sociedad.

La administración crónica de morfina se asocia con cambios específicos en el sistema opioide endógeno, especialmente en el cerebro. El efecto de la morfina sobre el sistema parece depender de la dosis utilizada, del tiempo de implantación y de la región estudiada. En general, en un estado inicial se observa una disminución de los niveles de péptidos de la familia POMC en el SNC, pero al aumentar la dosis de morfina y el tiempo de implantación los cambios retornan a los valores normales. No obstante, existen trabajos cuyos resultados discrepan de este patrón general de cambio (Höllt y col., 1978; Przewlocki y col., 1979; Martínez y col., 1990). Los sistemas neuropeptídicos como el opioide están sometidos a la regulación de una serie de mecanismos que actúan en la vía de biosíntesis (transcripción, translación, procesamiento del precursor o modificaciones post-translacionales), es por tanto, posible que algunos parámetros de la biosíntesis cerebral de POMC se alteren durante los primeros momentos del tratamiento con morfina. La β -end sufre cambios importantes durante la tolerancia-dependencia a opioides. Dentro de los procesos adaptativos que se producen con la presencia crónica de morfina se observa una inhibición de la liberación y biosíntesis de β -end en las neuronas POMC, especialmente en las localizadas en el núcleo arcuado y en las células del lóbulo neurointermedio de la hipófisis (Bronstein y col., 1990; García de Yébenes y Pelletier, 1993; Gianoulakis y col., 1981). Por tanto, en los cambios que se producen en el sistema opioide endógeno tras la administración crónica de opioides podrían estar implicados mecanismos de regulación de la expresión génica (Romualdi y col., 1991).

En la abstinencia también se producen cambios en el sistema opioide endógeno. La abstinencia que se produce como consecuencia de la retirada del opioide disminuye aun más la concentración de β -end en hipófisis, amígdala y médula espinal; mientras que la precipitada por la administración de naloxona incrementa la concentración de β -end en estriado, mesencéfalo, corteza y plasma y los disminuye en hipocampo e hipófisis (Gugehithlu y col., 1991; Rattan y col., 1992). A pesar de que la administración del derivado acetilado de la β -end atenúa la severidad del síndrome de abstinencia

(Garzón y Sánchez-Blázquez, 1992) y de que se ha sugerido un papel regulador, de carácter no competitivo, sobre el receptor μ ; ninguno de los trabajos a los que hasta ahora hemos hecho referencia han evaluado su contenido ni hecho un seguimiento de este derivado de la β -end en situaciones de tolerancia-dependencia. Posiblemente debido a la dificultad que entraña la separación y posterior cuantificación de ambos neuropéptidos. Dado que se trata de un péptido endógeno que acompaña a la β -end en su biosíntesis y secreción, los cambios que se produzcan en sus niveles neuronales como consecuencia de la administración crónica de opioides nos informarán sobre la regulación existente entre estos dos péptidos que tienen características fisio-farmacológicas tan distintas.

En la rata, la presencia crónica de morfina provoca en general la disminución tanto de los niveles de β -end como de los de NAC en todas las estructuras estudiadas, por otra parte, la abstinencia no modifica los efectos que la presencia continuada de morfina produce. Sin embargo, en el ratón los efectos no son tan homogéneos, encontrándose diferencias según la región estudiada. En las zonas más caudales del encéfalo, donde se encuentra el segundo grupo de células POMC, la presencia crónica de morfina provoca disminuciones en el contenido de los dos péptidos; mientras que en el resto de las regiones se producen incrementos, lo que confirma que las neuronas β -endorfinérgicas son reguladas de modo diferencial por los agonistas opioides (Bronstein y col., 1993). Aunque en trabajos previos no se habían detectado alteraciones en el procesamiento de los péptidos derivados de la β -end en el PAG y el hipotálamo tras un tratamiento crónico con morfina (Berglund y col., 1988), en nuestro estudio la relación β -end/NAC se encuentra alterada, tanto en estructuras directamente implicadas en la dependencia física a drogas (heroína y cocaína), como son el estriado, el septum, el tálamo (Sweep y col., 1989), como en hipófisis procedentes de animales tolerante-dependientes a morfina, lo que sugiere que los cambios en el procesamiento post-translacional también podrían ser región-dependiente. Por tanto, se puede concluir que los opioides exógenos pueden modificar el procesamiento de POMC, y modular la actividad acetil transferasa como ya sugirieron Weber y col. (1982).

Los cambios de distinto signo que se producen en los lóbulos hipofisarios de la rata pueden ser el resultado de diferencias en el mecanismo de liberación implicado. La liberación en el lóbulo anterior está controlada humoralmente por el hipotálamo, mientras que en el lóbulo neurointermedio está bajo control inhibitorio dopaminérgico (Houben y Deneef, 1994). Se ha descrito que el contenido de β -end del lóbulo neurointermedio de la hipófisis de la rata es más estable a las manipulaciones experimentales que el del lóbulo anterior (Hölldt y col., 1986); es probable que la β -end del lóbulo anterior y la del lóbulo neurointermedio tengan distinto significado fisiológico. En este trabajo únicamente el contenido de NAC se ha manifestado especialmente sensible a la retirada del opioide.

Nuestros datos indican que la administración crónica de opiáceos exógenos provoca un déficit en el contenido de los péptidos endógenos β -end y NAC que podría explicarse en base a mecanismos autorregulatorios. Del mismo modo, el síndrome de abstinencia podría enmascarar una deficiencia en opioides endógenos y originaría una pérdida de los mecanismos inhibitorios regulados por esos opioides provocando una activación de la síntesis que originaría un incremento en la liberación. En nuestro caso esta activación se manifiesta sobre todo en el caso del ratón, y en especial para el contenido de NAC, lo que vincula muy directamente a este péptido N-acetilado con los cambios acaecidos en las situaciones de abstinencia a opioides. Trabajos previos de nuestro grupo ya han demostrado su efectividad en estudios "in vivo" realizados en ratones tolerante-dependientes a morfina (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1992).

Se ha descrito la existencia de neuropéptidos antiopioides (Lake y col., 1991) capaces de alterar el desarrollo de la tolerancia-dependencia a morfina y el curso del síndrome de abstinencia y, que al igual que la NAC, antagonizan los efectos de la morfina y de ciertos péptidos endógenos (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1991; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1992), la NAC podría clasificarse dentro de este grupo. Estos datos apoyan la hipótesis de que se produce una interacción entre opioides endógenos y exógenos durante la adaptación fisiológica en respuesta a la inhibición

crónica de la función neural inducida por morfina (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1988).

En nuestro estudio se ha puesto de manifiesto que el sistema opioide endógeno del ratón es más sensible a los opioides exógenos que el de la rata. Las diferencias detectadas en la regulación del sistema opioide endógeno de las dos especies estudiadas podría ser el reflejo de los distintos métodos empleados en la inducción de la tolerancia. En la rata, la administración crónica de morfina se realizó mediante minibombas osmóticas con un flujo constante de liberación del opioide (Adams y Holtzman, 1990); mientras que en el ratón se implantó una suspensión oleosa de morfina, que obviamente permite una liberación más rápida de la morfina hacia el SNC (Blasig y col., 1973). Los datos también podrían señalar diferencias en el desarrollo de la tolerancia-dependencia, así como en la respuesta a la abstinencia, existentes entre las dos especies. De hecho existen trabajos que describen diferencias en la sensibilidad a la morfina en diferentes cepas de ratones, o incluso para la misma cepa procedente de suministradores distintos, aunque todos alcanzan niveles de tolerancia semejantes tras 72 h de exposición crónica a morfina (Lutty y Yoburn, 1991; Yoburn y col., 1989). Las diferencias entre rata y ratón también se detectan en estudios de fijación de radioligandos opioides lo que sugiere que las dos especies pueden diferir en la regulación opioide en estructuras específicas del SNC (Yoburn y col., 1991).

De estos estudios se puede concluir que los procesos de tolerancia-dependencia provocan variaciones en los niveles de los péptidos opioides endógenos β -end y NAC del SNC de la rata y el ratón. Los cambios observados en los niveles de NAC son de gran interés puesto que aportan una información valiosa acerca de este neuropéptido del que hasta el momento se desconoce su papel funcional aunque se le implica en la regulación de la función opioide y α_2 -adrenérgica.

2. Caracterización y distribución de la actividad GTPásica de baja Km en el SNC del ratón: efecto de la administración crónica de morfina

Los resultados de este estudio indican que en el SNC de ratón se encuentran presentes al menos dos actividades enzimáticas responsables de la hidrólisis de GTP: una de alta afinidad, con una Km entre 0.2–0.3 μ M, y otra de baja afinidad cuya actividad se manifiesta a concentraciones milimolares de sustrato. Estos valores son muy parecidos a los descritos para las actividades GTPásicas de otras membranas (Aktories y Jakobs, 1981; Barchfeld y Medzihradsky, 1984; Cassel y Selinger, 1976; Hilf y Jakobs, 1989; Hiramatsu y col., 1991; Koski y col., 1982; Morello y col., 1991).

Se ha podido demostrar una distribución diferencial de la actividad GTPásica de baja Km en el SNC de ratón. En el SNC de la rata se han descrito variaciones en la actividad de esta enzima en distintas áreas (Franklin y Hoss, 1984). Nuestros resultados ponen de manifiesto ciertas diferencias entre las dos especies de roedores (Martínez-Peña y Garzón, 1993). Los valores de las constantes de afinidad no se distribuyen homogéneamente a lo largo de las estructuras estudiadas. Estos resultados pueden explicarse en base a la distribución diferencial de las diversas clases de proteínas G en el SNC (Garzón y col., 1992; Orford y col., 1991; Young y col., 1993) y a las distintas características cinéticas de los diferentes tipos/subtipos de proteínas G, en cuanto a capacidad de unión y liberación de nucleótidos de guanina (Carty y col., 1990; Casey y col., 1990; Linder y col., 1990). En la literatura existen numerosos trabajos en los que se señala el efecto estimulador o inhibidor de los agonistas opioides sobre la actividad GTPásica de alta afinidad en el SNC de roedores (Barchfeld y Medzihradsky, 1984; Clark y col., 1986; Fedynyshyn y Lee, 1989; Franklin y Hoss, 1984; Ueda y col., 1987); sin embargo, no existían datos acerca de la influencia de presencia crónica de morfina sobre la liberación de Pi en el SNC del ratón.

Como ya se describió en el capítulo de resultados, la actividad GTPásica de alta afinidad y las constantes de afinidad de ciertas áreas, especialmente el tálamo, el mesencéfalo (incluyendo a la sustancia gris

periacueductal) o la médula espinal, se vieron modificadas tras el tratamiento crónico con morfina. Los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos de la morfina crónica son objeto de amplio estudio, en especial los cambios que acontecen en el número y afinidad de los receptores opioides. Los resultados, sin embargo, son en cierta medida contradictorios. En la mayoría de los trabajos se han utilizado técnicas de fijación de un radioligando específico para los receptores μ (DAGO, generalmente). En este tipo de estudios, la estimación del número de receptores es difícil especialmente en tejidos preparados a partir de animales tolerante-dependientes a la morfina.

Tras la presencia crónica de morfina se han descrito para los receptores opioides, i) ausencia de cambios tanto en el número como en la afinidad (Klee y Streaty, 1974; Yoburn y col., 1993); ii) reducción en la afinidad (Davis y col., 1979); iii) reducción en el número (Bhargava y Gulati, 1990; De Vries y col., 1991; Law y col., 1993); iv) aumento en el número (Brady y col., 1989; De Vries y col., 1993) y; v) pérdida de la alta afinidad para los agonistas asociada con una pequeña reducción en el número total de sitios de unión (Werling y col., 1989). En lo que sí parece que hay consenso es en el hecho de que el tratamiento crónico con antagonistas opioides siempre provoca incrementos en la densidad de receptores opioides en un proceso dosis-dependiente (Yoburn y col., 1988; 1989).

Yoburn y col. (1993) postulan que la dirección del cambio que provoca el tratamiento continuado con agonistas opioides depende de la dosis empleada, de la duración del tratamiento y de la eficacia intrínseca del agonista utilizado. La administración crónica de agonistas de alta eficacia (fentanil, etorfina) en el ratón provoca disminución de receptores μ , mientras que si se utilizan agonistas de eficacia baja o intermedia (morfina) se producen incrementos o no se detectan cambios. Esta hipótesis es compartida por Law y col. (1983) que demuestran que los agonistas de alta eficacia intrínseca son más efectivos en disminuir el número de receptores opioides δ cuando se incuban con células NG 108-15.

Los cambios registrados en la densidad de los receptores μ son heterogéneos, el grado de regulación es variable y no parece depender de los niveles iniciales de densidad del receptor (Brady y col., 1989; Lutfy y Yoburn, 1991; Vogel y col., 1990). Apoyando todas estas hipótesis se encuentran los trabajos de Bhargava y Gulati (1990) y de Brady y col. (1989) en los que se describen cambios de signo opuesto en el número de receptores μ de distintas regiones cerebrales de ratas tolerante-dependientes a la morfina. La médula espinal, el bulbo y la corteza muestran una disminución en el número de receptores μ tras 8 días de presencia crónica de morfina (Bhargava y Gulati, 1990) mientras que en el tálamo e hipotálamo de ratas implantadas con morfina durante 5 días se observa un incremento en el número de receptores μ (Brady y col., 1989).

Las diferencias en la regulación de los receptores también podrían ser reflejo de las modificaciones que la morfina ejerce sobre la actividad opioide endógena de las distintas regiones (Bronstein y col., 1993). En este punto hay que destacar las disminuciones que se han detectado en los niveles de β -end y de su derivado acetilado en el SNC de animales tolerante-dependientes a morfina. En general, existe una buena correlación entre la localización de los péptidos opioides y los receptores opioides correspondientes. Sin embargo, en determinadas áreas y utilizando técnicas autorradiográficas no se observa esta correlación entre la localización de los péptidos opioides endógenos y los receptores opioides, siendo especialmente llamativo el caso del receptor δ , localizado principalmente en las zonas encefálicas mas rostrales (Mansour y col., 1988), y las encefalinas, sus ligandos endógenos, que se encuentran distribuidas en todo el encéfalo (Tempel y Zukin, 1987). Tras el reciente clonaje de los receptores opioides esta observación se ha justificado en base a un mecanismo de transporte de receptores. Los receptores se sintetizan localmente y pueden ser trasladados a otras áreas (Mansour y col., 1995).

Las alteraciones que se detectan en el SNC de animales crónicamente tratados con morfina son mucho más ligeras que las observadas en cultivos celulares. Al estudiar la fijación opioide en células de neuroblastoma humano

SH-SY5Y tratadas crónicamente con morfina se aprecia una gran disminución en los sitios de unión (Carter y Medzihradsky, 1992). Dado que la morfina actúa con preferencia sobre el receptor μ , y que éste existe en todas las estructuras estudiadas (Mansour y col., 1988; Moskowitz y Goodman, 1985; Tempel y Zukin, 1987), los cambios detectados en la actividad GTPásica podrían explicarse en base a cambios en la densidad de receptores μ , sin embargo esta hipótesis no parece confirmarse. En este sentido, aunque el receptor μ es abundante en el tálamo, estriado y médula espinal, tras la presencia crónica de morfina la actividad enzimática se incrementó únicamente en el tálamo, la Km no se modificó en esta estructura y disminuyó en el estriado y la médula espinal. Barchfeld y Medzihrasky en 1984 describieron, al igual que nosotros, una menor actividad GTPásica en membranas de estriado preparadas a partir de ratas tolerante-dependientes a la morfina y lo justificaron como una respuesta compensatoria a los efectos estimuladores del opioide. La corteza, el hipotálamo, el PAG y el bulbo presentan niveles semejantes de receptores opioides μ , sin embargo, el tratamiento con morfina disminuyó la actividad en el PAG, incrementó la Km en el hipotálamo, la disminuyó en el PAG y no la modificó en la corteza.

El desarrollo de la tolerancia parece ser independiente de los cambios en el número de receptores y sugiere una localización intracelular del proceso. Trabajos recientes han implicado al sistema de transducción. El hecho de que la toxina pertúsica atenúe los signos del síndrome de abstinencia en ratas tolerantes a morfina implica de modo directo a las proteínas G (Lérida y col., 1989; Parolaro y col., 1990). La administración crónica de morfina disminuye el efecto de los nucleótidos de guanina sobre la unión opioide al receptor μ , en un proceso similar al que provoca el tratamiento de las membranas con toxina pertúsica (De Vries y col., 1991; De Vries y col., 1993; Werling y col., 1989). El hecho de que la fijación de agonistas δ y K no resulte afectada indica que la morfina actúa principalmente en los receptores μ o que las proteínas G afectadas son exclusivas de los receptores μ . Esta última idea es poco probable ya que los receptores μ y δ comparten en gran medida el sistema de transducción. La toxina pertúsica ADP-ribosila las proteínas G asociadas tanto a los receptores μ como a los δ

(Bokoch y col., 1984).

Trabajos recientes han puesto de manifiesto la existencia de interacciones entre las proteínas G y algunos componentes del citoesqueleto celular, aún por determinar, lo que ha sugerido que la movilidad de receptores y proteínas G en la membrana podría ser restringida. Se ha propuesto un modelo en el que receptores y proteínas G se encuentran organizados en complejos supramoleculares en cuya formación también podrían participar las subunidades β . Este modelo de compartimentalización de la membrana plasmática se ha desarrollado a raíz de la observación de que diferentes receptores, entre ellos el α_2 -adrenérgico y el m_4 -muscarínico, son capaces de unirse a las mismas proteínas G "in vitro" pero no comparten la misma población de proteínas G en células intactas (Neubig, 1994). Del mismo modo, el tratamiento crónico de células NG 108-15 con el agonista opioide etorfina provoca cambios únicamente en el receptor opioide. La fijación a los receptores muscarínicos, de prostaglandina E_1 y α_2 -adrenérgicos no se ve afectada (Law y col., 1983). Atendiendo a este modelo de compartimentalización, con la administración crónica de morfina se afectaría únicamente la población de proteínas G asociadas al receptor opioide μ y en mucha menor medida las proteínas G asociadas a los receptores que coexisten en la misma neurona. Posiblemente se produzca una disfunción en la relación entre el receptor μ y las proteínas G o que éstas sufran alguna alteración en su expresión o en su densidad. La administración crónica de morfina provoca un gran incremento en la producción celular de AMPc sin modificar la afinidad o el número de sitios de unión μ , lo cual hace suponer a algunos autores que la tolerancia-dependencia es consecuencia de que una sobreexpresión del sistema de transducción (De Vries y col., 1991; 1993).

Anteriormente se ha descrito la diferencia de efectos, en cuanto a cambios en la densidad de receptores opioides, que provocan los tratamientos crónicos con agonistas opioides en función de su eficacia intrínseca. Estas diferencias también se manifiestan en cambios en el sistema de transducción. En efecto, el tratamiento crónico de cultivos celulares de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y con el agonista opioide tipo μ de alta eficacia

DAGO no se traduce en cambios en la densidad de proteínas G, mientras que si se emplean agonistas de baja eficacia (morfina, morficeptina) se producen incrementos en los niveles de distintas proteínas transductoras (Ammer y Schulz, 1993). Una situación semejante se ha observado en la línea celular de neuroblastoma x glioma NG 108-15 en la que la ocupación de los receptores δ por el opioide de alta eficacia DADLE provoca el desacoplamiento de los receptores de la actividad GTPásica de alta afinidad (Law y col., 1983; Vachon y col., 1987). Esto podría ser consecuencia de que los agonistas de alta eficacia son capaces de desacoplar los receptores de los sistemas de transducción implicados, en contraposición con los de baja eficacia que a pesar de promover la aparición de tolerancia-dependencia no alteran las relaciones entre los receptores opioides y sus proteínas G asociadas. Como conclusión se puede decir que ligandos con diferente actividad intrínseca son capaces de provocar modificaciones distintas actuando sobre los mismos receptores. En el mesencéfalo de ratas tolerante-dependientes a morfina tanto la actividad GTPásica de alta afinidad como la estimulación que sobre ella ejerce el agonista DAGO se encuentran disminuidas. Dado que la estimulación de la GTPasa de baja K_m provocada por los agonistas en membranas refleja los acontecimientos que se producen inmediatamente a continuación de la activación del receptor por la unión de un agonista, Tao y col. (1993) proponen que la interacción entre los receptores opioides μ y las proteínas G se encuentra alterada tras el tratamiento crónico con morfina. Esta hipótesis es consistente con los trabajos de Wong y col. (1992) realizados sobre membranas de médula espinal de rata.

Los cambios en la actividad GTPásica tras la presencia crónica de morfina podrían ser interpretados como resultado de alteraciones en la actividad enzimática intrínseca de las subunidades α de las proteínas G, sin embargo, la multiplicidad de proteínas G existentes y sus distintas características cinéticas en cuanto a capacidad de unión y liberación de nucleótidos de guanina (Carty y col., 1990; Casey y col., 1990; Linder y col., 1990) vuelven a indicar que las variaciones en la densidad de las proteínas G podrían ser las responsables de los cambios observados. Esta hipótesis estaría apoyada por distintos trabajos bibliográficos: i) Orford y

col. (1991) describieron aumentos en la densidad de subunidades $G_{11\alpha}$, $G_{12\alpha}$ y G_{α} en cerebro de rata como consecuencia de determinadas manipulaciones experimentales; ii) la inducción de tolerancia-dependencia a opioides aumenta los niveles de subunidades G_{α} en el plexo mientérico de cobaya y en determinadas zonas del SNC de la rata (Ammer y col., 1991; Nestler y col., 1989; Rasmussen y col., 1990); iii) la exposición crónica a opioides de las células SH-SY5Y incrementa la abundancia de distintas proteínas G (Ammer y Schulz, 1993); iv) los niveles de $G_{12\alpha}$ se incrementan en determinadas zonas cerebrales de ratones tolerante-dependientes a morfina (Garzón y col., 1992); v) en el SNC de ratas tolerante-dependientes a morfina se observan incrementos en el mRNA que codifica para las subunidades G_{α} y G_{β} (Parolaro y col., 1993). Por el contrario, también se han descrito disminuciones en la densidad de proteínas G tras la administración crónica de agonistas μ en neuronas del cerebro posterior en cultivo (Vogel y col., 1990). Los cambios de distinto signo encontrados en las Kms de las distintas áreas tras la administración crónica de morfina podrían explicarse en función de alteraciones en la proporción relativa de los diferentes tipos/subtipos de proteínas transductoras que median los efectos del opioide (Ueda y col., 1988).

Existen numerosos trabajos que documentan la regulación de los niveles de proteínas G tras la activación crónica de receptores del tipo inhibitorio. Por ejemplo, la exposición crónica de adipocitos aislados a agonistas del receptor de adenosina A_1 conduce a una disminución del número de proteínas G_i (Green y col., 1990). En la línea celular SH-SY5Y la morfina crónica aumenta los niveles de las subunidades $G_{11\alpha}$, $G_{12\alpha}$, G_{α} , G_{β} y G_{γ} , es decir, se afectan todas las subunidades α independientemente de su actividad funcional (Ammer y Schulz, 1993). Por tanto no resultan modificadas únicamente las subunidades que se acoplan directamente con los receptores opioides μ . Sin embargo, las neuronas del estriado de rata en cultivo responden al tratamiento con morfina crónica con una elevación de los niveles de proteínas G_{α} y una disminución en el contenido de G_{β} que se acompaña de un incremento en la producción de AMPc mediada por los receptores dopaminérgicos D_1 y β -adrenérgicos (Van Vliet y col., 1991). La

activación continuada de los receptores μ modifica los niveles de G_i en determinadas áreas del SNC de la rata (Basheer y col., 1992; Basheer y Tempel, 1993) y en ileum de cobaya (Lang y Schulz, 1989). Por otra parte, la administración i.c.v. de antisueros generados contra distintas secuencias de las subunidades $G_{i\alpha}$ potencia la actividad antinociceptiva de los opioides morfina y β -end y atenúa la incidencia del síndrome de abstinencia a opioides en el ratón (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1992b; 1994a). Estos datos pueden ser explicados por fenómenos de convergencia de efectos entre los sistemas receptoriales que controlan la adenilato ciclasa (Ammer y Schulz, 1993). En este sentido, el receptor α_2 -adrenérgico coexiste con el receptor μ en el SNC, comparte con él el sistema de transducción, regula los mismos efectores (Gilman, 1987) y su ligando endógeno, la noradrenalina, modifica la expresión de la dependencia celular a la morfina (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1992).

La persistente estimulación de un receptor acoplado a proteínas G puede regular la función de otros receptores también acoplados a proteínas G. La tolerancia-dependencia a la morfina es el resultado no sólo de cambios a nivel del receptor μ sino también a nivel de las proteínas G asociadas a estos receptores y, por tanto, de las interacciones del sistema opioide con otros sistemas de neurotransmisión. Esta hipótesis conectaría con los trabajos clásicos de Collier en los que se propone que en situaciones de tolerancia-dependencia no sólo resultan afectadas las neuronas con receptores opioides sino también las neuronas que con las opioides se relacionan (Collier, 1980).

Se puede concluir que la actividad GTPásica de baja K_m presenta una distribución diferencial en el SNC de ratón. Los cambios que se producen tras la administración crónica de morfina varían en función del área del SNC considerada. Estos cambios parecen estar mediados por el sistema de transducción que podría ver alterada i) su relación con los receptores a los que se encuentra asociado y/o, ii) su expresión.

3. Actividad GTPásica de alta afinidad sensible a opioides

Koski y Klee (1981) demostraron que los opioides, en un proceso mediado por receptor, estimulan la actividad GTPásica de baja Km en células NG 108-15. En sus experimentos la potencia de los opioides presentaba una buena correlación con las afinidades descritas en los experimentos de fijación y con la inhibición de la adenilato ciclasa. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la potenciación por opioides de la actividad GTPásica de alta afinidad en el SNC de ratón y en células NG 108-15 está mediada por receptores opioides ya que es dependiente de concentración, ligando-selectiva y reversible por antagonistas opioides. En primer lugar, ha quedado demostrada la importancia del diseño del protocolo experimental a la hora de estudiar los distintos aspectos funcionales de la transducción asociada a opioides.

Como ya observaron Koski y Klee (1982) en células híbridas NG 108-15, la presencia del ión sodio en el ensayo es necesaria para que los opioides manifiesten su efecto sobre la actividad enzimática en el SNC del ratón. El sodio atenúa las interacciones entre proteínas G y receptores desocupados, reduciendo en gran medida la actividad GTPásica basal (Costa y col., 1990). Esta propiedad aumenta la disponibilidad de proteínas G no activadas que ahora pueden ser utilizadas por receptores ocupados por agonistas produciendo así un incremento en la hidrólisis de GTP.

La estimulación de la actividad GTPásica de baja Km en membranas de sustancia gris periacueductal (PAG) de ratón, de médula espinal (ME) de ratón y de células híbridas de neuroblastoma x glioma NG 108-15 es dependiente de la concentración de agonista empleada. Los antisueros generados frente a los receptores opioides μ y δ nos han permitido evaluar su influencia en los efectos de los distintos opioides sobre la GTPasa. Del mismo modo al disponer de antisueros específicos contra las proteínas $G_{12}\alpha$ y $G_{13}\alpha$, de gran importancia en el efecto antinociceptivo de los agonistas opioides μ/δ (Sánchez-Blázquez y col., 1993), hemos podido evaluar la participación de estas proteínas en la estimulación de la actividad GTPásica

de alta afinidad por los distintos agonistas. Todo ello ha hecho posible estudiar la relación entre la concentración de agonista (grado de ocupación de los receptores) y la estimulación de la actividad GTPásica por él provocada.

En membranas de PAG de ratón los agonistas opioides estimulan la actividad GTPásica de alta afinidad. Se estudiaron: el DAGO, selectivo del receptor opioide μ ; la morfina, agonista preferente del receptor μ ; la β -end, agonista opioide μ/δ ; la DADLE, agonista opioide δ/μ ; y los agonistas selectivos del receptor δ , DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II. A concentraciones de 1 μ M, los valores de activación de la actividad GTPásica oscilan entre un 65% para la β -end y un 82% para la DADLE. La única excepción es el DPDPE que a esa concentración sólo alcanza valores del orden del 40% sobre la actividad basal. Al aumentar la concentración de DPDPE se alcanzan valores de estimulación semejantes a los del resto de agonistas. Parece, por tanto, que el DPDPE actúa con menor eficacia o afinidad por el receptor opioide (δ) en la activación de la GTPasa de alta afinidad.

Los antagonistas opioides naloxona (antagonista de los receptores μ , δ y κ) e ICI 174864 (antagonista selectivo de los receptores δ) (Cotton y col., 1984) redujeron la estimulación de la GTPasa producida por los agonistas opioides, lo que confirma la implicación de los receptores opioides en los efectos estudiados. Los agonistas con preferencia por el receptor μ son más sensibles a la naloxona que al del antagonista δ selectivo ICI 174864. De hecho, las curvas de estimulación del DAGO y de la morfina no se vieron modificadas en presencia de 1 μ M de ICI 174864. La β -end, agonista μ/δ , se ve antagonizada tanto por la naloxona como por el ICI 174864 aunque éste último es más débil, dato en concordancia con lo publicado por Ableitner y Schulz (1992). Con respecto a los agonistas tipo δ , la naloxona y el ICI 174864 antagonizan el efecto del agonista δ/μ DADLE sobre la GTPasa. Por otra parte, el DPDPE y la [D-Ala²]-Deltorfina II presentan diferente sensibilidad al ICI 174864. Mientras que sobre la curva de la [D-Ala²]-Deltorfina II el efecto antagonista del ICI 175864 se manifiesta de un modo drástico, en la curva del DPDPE dicho efecto es mucho más moderado. Así

mismo, la curva del DPDPE es muy sensible a la naloxona mientras que la de la [D-Ala²]-Deltorfina II lo es menos.

Se podría decir que los efectos provocados por los dos agonistas δ -selectivos sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón tienen distintas características. Estas diferencias también se ponen de manifiesto al estudiar su efecto sobre la antinocicepción supraspinal (Jiang y col., 1990). La capacidad de los agonistas δ para modular la antinocicepción mediada por el receptor μ (Porreca y col., 1992; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989) llevó a proponer que ese efecto podría estar mediado por complejos receptoriales formados por los receptores μ - δ y quizás también por los K entre los se podrían establecer interacciones (Rothman y col., 1988). El modelo, propuesto en base a estudios "in vitro", postula la existencia de receptores δ como tales (δ_{ncx} , no asociados al complejo) y de receptores δ asociados al complejo (δ_{cx}) (Xu y col., 1993). El desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos para el receptor δ ha permitido la caracterización farmacológica de los subtipos δ en estudios de antinocicepción, y en base a estos estudios "in vivo" realizados en ratón, se ha propuesto la existencia de dos subtipos de receptores δ , el δ_1 y el δ_2 . El DPDPE sería ligando selectivo del δ_1 , y la [D-Ala²]-Deltorfina II sería ligando selectivo para el δ_2 . El subtipo δ_1 , dado que parece mediar en la analgesia supraespinal, sería más abundante en estructuras encefálicas, por el contrario, el subtipo δ_2 , responsable de la antinocicepción espinal, estaría localizado preferentemente en zonas espinales (Mattia y col., 1992; Takemori y Portoghesi, 1993).

El uso de agonistas para la caracterización de receptores acoplados a proteínas G presenta ciertas limitaciones dada su mayor afinidad por una subpoblación de receptores, los receptores preacoplados (en estado de alta afinidad). Sin embargo, los antagonistas se unen con afinidades muy parecidas a los receptores preacoplados y a los desacoplados (Molinoff y col., 1981). Por ello, con el desarrollo de antagonistas selectivos no peptídicos para los subtipos δ_1 y δ_2 se ha podido profundizar en la caracterización farmacológica de los receptores δ . El BNTX (hidrocloruro de benzilidene-naltrexona) es un antagonista selectivo del subtipo δ_1 (Portoghesi y col.,

1992) y el NTB (naltribén) es un antagonista selectivo para el subtipo δ_2 (Sofuoglu y col., 1991).

En nuestro sistema experimental el efecto diferencial de los antagonistas se manifiesta en la ME y no en el PAG, donde BNTX y NTB antagonizan tanto al DPDPE como a la [D-Ala²]-Deltorfina II. Destaca además que la eficacia de los dos agonistas δ en la ME es mucho menor que en el PAG siendo la relación existente entre el máximo de estimulación PAG/ME para el DPDPE de 1.2 y para la [D-Ala²]-Deltorfina II de 1.6. En las células NG 108-15, que contienen un único tipo de receptores opioides δ (Chang y col., 1978), el efecto estimulador de DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II sobre la actividad GTPásica de baja Km se bloquea totalmente por el antisuero anti- δ . En estas células los antagonistas selectivos BNTX y NTB se mostraron como herramientas útiles a la hora de detectar diferencias en los efectos del DPDPE y de la [D-Ala²]-Deltorfina II. En este sentido, el DPDPE, ligando selectivo para el subtipo δ_1 , ve modificado su comportamiento estimulador en presencia de BNTX, antagonista selectivo δ_1 , mientras que la [D-Ala²]-Deltorfina II, ligando selectivo del δ_2 , es antagonizada con preferencia por el NTB, antagonista selectivo de este subtipo.

Del estudio de la estimulación de la actividad GTPásica provocada por DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II en una estructura encefálica (PAG) y en la ME de ratón se concluye que, en ambas zonas el antisuero generado frente al receptor δ bloquea la respuesta de las membranas frente al DPDPE y a la [D-Ala²]-Deltorfina II. Al igual que en estudios de antinocicepción y de fijación de radioligandos, el antisuero no distingue entre los dos subtipos de receptores. Esto podría significar, que al menos, el extremo amino terminal de los dos subtipos es idéntico puesto que el antisuero generado frente a los 16 primeros aminoácidos de dicho extremo modifica la respuesta de los dos agonistas en las dos áreas. La posible glicosilación que el residuo 18 del receptor opioide δ puede sufrir no interfiere con el reconocimiento del extremo amino terminal por el antisuero (Garzón y col., 1994a). Recientemente se ha sugerido que δ_1 y δ_2 difieren en la secuencia de los dominios intracelulares, por ejemplo en el extremo carboxilo terminal o en el

tercer bucle intracelular (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1995a).

En cualquier caso, todavía no está claro si los dos subtipos son en realidad dos entes moleculares distintos o si se trata de dos respuestas farmacológicas distintas de un mismo receptor, en función de la transducción que active el ligando que se le una. Disminuyendo la expresión de distintas subunidades α en el SNC de ratón mediante la administración i.c.v. de oligodesoxinucleótidos antisentido (ODN) frente a los diferentes RNAm que las codifican se ha obtenido información muy valiosa. La administración de ODN para $G_{o1}\alpha$ bloquea selectivamente la analgesia supraespinal provocada por el DPDPE, mientras que la inyección de ODN para $G_q\alpha$ disminuye la provocada por la [D-Ala²]-Deltorfina II. Por el contrario, la administración de $G_{i1}\alpha$ o de $G_{x1}\alpha$ no afecta la analgesia evocada por los DPDPE o [D-Ala²]-Deltorfina II y si se utilizan $G_{i2}\alpha$, $G_{i3}\alpha$, $G_{o2}\alpha$ o $G_{i1}\alpha$ el efecto de los dos agonistas se ve disminuído (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1995a). Por ello, en nuestro laboratorio se está trabajando en la actualidad con la hipótesis de la existencia de los dos subtipos de receptores δ que utilizan proteínas transductoras diferentes. Lo que parece claro es que δ_1 y δ_2 no participan del mismo modo en un proceso tan importante para la farmacología opioide como es la tolerancia-dependencia en la cual parece estar más implicado el subtipo δ_2 (Miyamoto y col., 1994). También pudiera suceder que el mismo receptor viera modificada su respuesta frente a un mismo agonista dependiendo de la zona de estudio. Las señales reguladoras en el SNC no son iguales en todas las áreas, de hecho, diferencias en el sistema de transducción podrían ser las responsables de estos cambios de respuesta. El sistema de transducción podría diferir en estructuras encefálicas y espinales. La eficacia de un agonista sobre un receptor, estimada por la estimulación de la actividad GTPásica que éste provoca, podría variar en función de las proteínas transductoras disponibles en ese momento en esa zona en concreto. En este sentido, el trabajo de Garzón y col. (1994c) es revelador al demostrar la diferente eficacia de los agonistas opioides en activar distintos tipos de proteínas G reguladas por un mismo receptor opioide.

En el PAG de ratón, el antisuero anti- $G_{12}\alpha$ disminuyó la eficacia estimuladora de todos los opioides estudiados, tanto μ - como δ -preferentes. Por el contrario, el antisuero anti- $G_{x/2}\alpha$ restó eficacia a los agonistas que son capaces de unirse al receptor opioide μ , es decir, al DAGO, a la morfina, a la β -end y a la DADLE aunque en el caso de esta última únicamente a las concentraciones más bajas. El anti- $G_{x/2}\alpha$ no modificó la potencia de los agonistas δ -selectivos DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II. Estos resultados indicarían que en la estimulación de la actividad GTPásica mediada por el receptor δ no participaría la subunidad $G_{x/2}\alpha$, y que en la mediada por el receptor μ participarían las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{x/2}\alpha$. Confirman pues la hipótesis sugerida anteriormente, un mismo receptor es capaz de trabajar con distintas proteínas transductoras para producir el mismo efecto. Estudios previos de nuestro grupo en los que se evaluaba la participación de los receptores opiodes μ y δ en la analgesia supraspinal del ratón confirman estos resultados (Sánchez-Blázquez y col., 1993). En la antinocicepción μ participan las proteínas G_{12} y $G_{x/2}$, mientras que en la antinocicepción δ participan las proteínas G_{12} y G_{13} (Prather y col., 1994; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1993b). Aún queda por explorar el papel que otros subtipos de proteínas G ($G_4\alpha$, $G_{12}\alpha$, $G_{13}\alpha$) puedan desempeñar.

Las secuencias de los receptores opioides μ y δ presentan diferencias en el dominio implicado en la unión con las subunidades α , en concreto, en el tercer segmento interno y en el extremo carboxilo terminal (Chen y col., 1993; Evans y col., 1992; Kieffer y col., 1992). Del mismo modo, las distintas subunidades α presentan variaciones en los dominios carboxilo terminales donde interactúan con los receptores (Itoh y col., 1986; Jones y Reed, 1987; Strathmann y col., 1989). Por tanto, estas diferencias podrían ser las responsables del acoplamiento diferencial de los receptores μ y δ a las distintas proteínas G.

La subunidad $G_{x/2}\alpha$ presenta una velocidad de hidrólisis de GTP mucho más lenta que la de otras subunidades α . Para las subunidades $G_4\alpha$, $G_6\alpha$ y $G_{12}\alpha$ se ha descrito una tasa de hidrólisis 200 veces más rápida que para la $G_{x/2}\alpha$, mientras el tiempo medio de hidrólisis para esta subunidad se ha estimado en

10-12 minutos para las demás se ha establecido en pocos segundos (Casey y col., 1990). Estas peculiaridades cinéticas de la subunidad G_{α} la brindan la posibilidad de controlar señales de aparición lenta y de vida media muy larga (Casey y col., 1990). Este perfil de la subunidad G_{α} se ajusta a las características de la antinocicepción de morfina y de β -end: efecto analgésico lento, prolongado y, en el caso de la morfina, muy resistente a la toxina pertúsica (Sánchez-Blázquez y col., 1993). Por ello, para estudiar la participación de la subunidad G_{α} en los efectos estimulatorios de los opioides fue necesario aumentar la concentración de sustrato (GTP) o disminuir el tiempo de incubación de las membranas con el GTP. En los dos casos los resultados fueron idénticos por lo que se consideraron válidas las dos aproximaciones experimentales. Con la segunda de las aproximaciones se aseguró que la concentración de sustrato en el comienzo de la reacción fuera la suficiente como para que todos los tipos de subunidades α , independientemente de su sensibilidad por el GTP, pudieran manifestarse. La importancia que la disponibilidad de sustrato tiene sobre la actividad funcional del sistema de transducción ha quedado, por tanto, demostrada en esta serie de experimentos.

Con respecto a la posibilidad de modificar el sistema de transducción mediante tratamientos "in vivo", resultados previos de nuestro grupo ya habían puesto de manifiesto la capacidad de las IgGs para alcanzar diferentes subunidades G_{α} en la membrana neuronal (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1992b; 1993; Sánchez-Blázquez y col., 1993). Eran trabajos en los que se evaluaba la actividad antinociceptiva de distintos opioides tras la administración "in vivo" de antisueros específicos dirigidos contra distintas secuencias de las subunidades G_{α} . Dado que la administración de una única dosis de IgGs modificaba la respuesta analgésica durante varios días, se sugirió la necesidad de síntesis proteica para recuperar la función perdida (Sánchez-Blázquez y col., 1993). Esta síntesis de "de novo" de proteínas G tras una manipulación experimental también ha sido sugerida por otros autores al estudiar el efecto de agonistas opioides sobre la regulación del sistema de transducción en sistemas celulares (Ammer y Schulz, 1993; Eriksson y col., 1992). La administración "in vivo" de los antisueros anti-

$G_{12}\alpha$ y anti- $G_{x/y}\alpha$ también modifica el binding de DAGO a fracciones P_2 del PAG de ratón (Sánchez-Blázquez y col., 1993). La actividad GTPásica de las membranas de PAG también puede ser modificada por la administración i.c.v. de antisueros específicos. En este sentido, el efecto estimulador de los opioides DAGO, morfina y DADLE sobre la GTPasa de alta afinidad del PAG de ratones inyectados con los antisueros anti- $G_{12}\alpha$ y anti- $G_{x/y}\alpha$ se encontró disminuído. El efecto de DADLE fue más sensible al anti- $G_{12}\alpha$, que al anti- $G_{x/y}\alpha$, el patrón contrario se observó al estudiar la morfina, que resultó ser mucho más sensible al anti- $G_{x/y}\alpha$. La estimulación de la actividad GTPásica de baja K_m provocada por el DAGO se redujo del mismo modo en presencia del anti- $G_{12}\alpha$ y del anti- $G_{x/y}\alpha$. El mismo patrón de respuesta se observó al estudiar la modificación de la respuesta GTPásica sensible a opioides en fracciones P_2 de PAG de ratón tratadas "in vitro" con estos antisueros. Se desconoce por el momento si las IgGs, desde el exterior de la membrana, pueden alcanzar las subunidades α de las proteínas G o si de algún modo son transportadas al interior de las neuronas. El acceso de las IgGs a sus antígenos podría estar favorecido por la compleja organización del sistema de transducción en los sinaptosomas (Coulter y Rodbell, 1992). También se ha descrito la existencia de péptidos que se encuentran insertados en la membrana plasmática y que son capaces de regular el sistema de transducción (Mousli y col., 1990).

La administración i.c.v. del modificador covalente β -funaltrexamina provoca un antagonismo irreversible de la antinocicepción opioide, así como una disminución de la fijación opioide en el PAG. Este efecto sobre la fijación se observa principalmente en áreas periventriculares disminuyendo en el resto del mesencéfalo (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989). Un comportamiento semejante se observó tras la administración i.c.v. de los antisueros. La estimulación de la actividad GTPásica por opioides y la fijación de DAGO (Garzón y col., 1994c; Sánchez-Blázquez y col., 1993) se redujo en áreas del PAG cercanas al acueducto (aproximadamente 0.5mm de espesor). Fenómenos de difusión desde los ventrículos podrían ser responsables de estas observaciones. Parece, por tanto, lógico concluir que al menos una pequeña población de receptores opioides y de proteínas G del

PAG participan en la antinocicepción que la administración i.c.v. de los opioides pone de manifiesto.

Un capítulo interesante de este trabajo ha sido la respuesta encontrada en la actividad GTPásica de las células híbridas NG 108-15 frente a los agonistas μ . El DAGO y la morfina son capaces de estimular en estas células dicha actividad enzimática de modo concentración-dependiente. Dado que estas células presentan, según la mayoría de autores, un único tipo de receptores δ era lógico que los agonistas que se pudieran unir al receptor δ , DADLE, DPDPE, [D-Ala²]-Deltorfina II o β -end, independientemente de la afinidad con que lo hagan, desplegaran esa capacidad estimuladora (Koski y Klee, 1982; Ott y col., 1989; Selley y Bidlack, 1992; Vachon y col., 1987). El efecto observado con el DAGO y la morfina está mediado por receptores opioides puesto que el antagonista opioide μ -selectivo, CTOP (Gulya y col., 1986) antagoniza su efecto. De hecho, se eligió este antagonista en vez de la naloxona por el carácter inespecífico de ésta. El antagonista δ -selectivo ICI 174864 en las células presenta el mismo patrón de antagonismo que en el PAG, con la excepción de la morfina, que ahora ve modificada su respuesta en presencia del antagonista δ -selectivo. Al igual que sucedía en el PAG i) la estimulación que la [D-Ala²]-Deltorfina II provoca en las membranas de las células NG 108-15 es más sensible al ICI 174864 que la provocada por el DPDPE, y ii) a concentraciones bajas el DPDPE estimula menos que el resto de los agonistas ensayados. Los efectos estimuladores de los agonistas μ sobre la GTPasa de alta afinidad en estas células, aunque de menor magnitud que los provocados por los agonistas δ , resultaron inesperados. En otros trabajos también se habían detectado este tipo de efectos estimulatorios sobre el sistema de transducción al trabajar con agonistas μ y K en distintos sistemas celulares, que presentaban sólo poblaciones homogéneas de receptores δ (Prather y col., 1994). Estos autores sugieren que como el DAGO es capaz de inhibir la adenilato ciclasa en las células NG 108-15, posee cierta actividad como agonista δ . De hecho, recientemente en nuestro laboratorio se ha observado que el tratamiento "in vivo" de células NG 108-15 con el modificador covalente β -funaltrexamina previene de la estimulación que el DAGO y la morfina ejercen sobre la actividad GTPásica de alta afinidad de

las células. Sería interesante la determinación de los niveles de RNAm para el receptor μ en estas células puesto que de existir es poco abundante ya que no se pone de manifiesto ni utilizando técnicas de fijación ni de inmunodetección.

La actividad del DAGO, la morfina y la β -end sobre la GTPasa de alta afinidad de membranas del SNC de ratón parece estar principalmente mediada por el receptor μ . El antisuero anti- δ no modifica las curvas de activación de estos agonistas y sí que lo hacen los antisueros anti- μ . Del mismo modo, el antagonista δ -selectivo ICI 174864 es inefectivo en la reducción de los efectos estimuladores provocados por el DAGO y la morfina. En este sentido, trabajos previos de nuestro grupo, en los que se estudiaba la fijación de morfina y β -end en el cerebro de ratón, pusieron de manifiesto que los dos agonistas tenían afinidades muy parecidas por el receptor μ . Se calculó una relación de afinidades μ/δ de 0.027 para la morfina y de 0.17 para la β -end (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989). Dado que en el PAG de ratón es mayor la densidad del receptor μ que la del δ (Mansour y col., 1987; 1988; Sharif y Hughes, 1989; Tempel y Zukin, 1987) la mayor parte de la estimulación promovida por los dos opioides estará mediada por el receptor μ aunque en las concentraciones más elevadas podría intervenir también el receptor δ . Sin embargo, como ya hemos apuntado anteriormente, de los datos resultantes de los experimentos realizados con el antisuero anti- δ y con el antagonista selectivo de los receptores δ ICI 174864 parece deducirse que la participación del receptor δ en la estimulación de morfina y β -end sobre la actividad GTPasa de baja Km del PAG de ratón es mínima.

El antisuero MU/2EL está generado frente a una secuencia del segundo bucle extracelular (208-216) del receptor μ de la rata, de modo que a una concentración adecuada reconoce todas las posibles variantes del receptor opioide μ , independientemente del grado de glicosilación, presentes en el área de estudio y abole por completo el efecto estimulatorio de los agonistas μ -preferentes DAGO y morfina. El antisuero MU/T está generado frente a los 16 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la secuencia del receptor μ de la rata. El péptido antigénico incluye un posible sitio de glicosilación,

el residuo 9 (Chen y col., 1993), por ello a pesar de utilizar cantidades muy altas de antisuero no es capaz de bloquear todos los receptores μ de la preparación, posiblemente las glicosilaciones en esa posición los hagan insensibles, y una parte del efecto estimulador de los agonistas se sigue observando. Los azúcares parecen, por tanto, dificultar el reconocimiento de la proteína antigénica.

Como la especificidad de los antisueros empleados en este trabajo está suficientemente documentada (Garzón y col., 1994b; 1995; Garzón y Sánchez-Blázquez, 1995), el que los efectos estimuladores de DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II sobre la actividad GTPásica de baja Km del SNC del ratón se vieran modificados por la presencia en el ensayo de los antisueros anti- μ resultó en cierta medida sorprendente. Sin embargo, trabajos previos en los que se evaluaba la eficiencia antinociceptiva en el test del tail-flick de diferentes ligandos opioides administrados por vía i.c.v. a ratones ya habían puesto de manifiesto un cierto efecto μ de diversos agonistas δ opioides, en especial DPDPE y DADLE. En estas experiencias se demostraba que los ligandos δ también necesitan unirse a los receptores μ para producir altos niveles de analgesia supraespinal (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989). Estos datos se pueden interpretar como, i) posible unión de los agonistas δ a los receptores opioides μ , sobre todo a las concentraciones más altas estudiadas; ii) existencia de complejos opioides de carácter funcional formados por receptores μ y δ . Como ya se ha comentado, este tipo de asociaciones han sido propuestas a partir de estudios realizados "in vitro", no ha podido ser demostrada en ensayos "in vivo" pero no puede descartarse.

En los ensayos "in vivo" se ha observado que la antinocicepción μ está modulada por los receptores δ : la coadministración de morfina y dosis subanalgésicas de DPDPE o [D-Ala²]-Deltorfina II en el ratón provoca modulación positiva de la antinocicepción, mientras que la coadministración de met-enkefalina y morfina provoca modulación negativa. Los dos efectos son sensibles al antagonista δ selectivo ICI 174864 y al antagonista δ_2 -selectivo NTII (naltrindol-5'-isotiocianato) pero no al antagonista δ_1 -selectivo DALCE ([D-Ala², Leu⁵, Cys⁶]encefalina). Por tanto, el subtipo δ_2 parece ser

el receptor δ implicado en la modulación de la antinocicepción de morfina (Porreca y col., 1992). Este subtipo podría ser el mismo que otros grupos, en base a estudios "in vitro" han denominado δ_{ex} , es decir, el receptor δ que existiría asociado al receptor μ formando un complejo receptorial opioide (Rothman y col., 1988; Xu y col., 1993). Si este tipo de complejos receptoriales existen, podría suceder que los antisueros anti- μ bloquearan los receptores μ pero debido al enorme tamaño de las IgGs, éstas impedirían también el acceso de los agonistas δ a los receptores δ asociados. El grado de estimulación sobre la actividad GTPásica de estos agonistas se encontraría, por tanto, disminuido. El hecho de que no suceda lo contrario, es decir, que al poner el antisuero anti- δ no se bloqueen los efectos estimulatorios de los agonistas μ podría indicar que en el complejo habría muchos más receptores μ que δ , de modo que aunque al bloquear los receptores δ también se impidiera el acceso a algunos receptores μ , todavía quedarían suficientes como para que el agonista μ promoviera estimulación de la actividad GTPásica. Los trabajos que describen la distribución de receptores opioides μ y δ en el SNC de ratón avalan esta hipótesis puesto que tanto en la médula espinal como en el PAG la densidad de receptores μ es mucho mayor que la de receptores δ (Mansour y col., 1988). Los datos también parecen señalar que los complejos serían distintos en zonas espinales o en zonas encefálicas puesto que los efectos de los antisueros anti- μ son distintos en una y en otra. El antisuero MU/2EL modifica la respuesta frente al DPDPE y a la [D-Ala²]-Deltorfina II más en el PAG que en la ME, mientras que el MU/T disminuye más el efecto estimulatorio de los dos agonistas en la ME que en el PAG. De estos resultados parece desprenderse que en la ME, el receptor μ se encontraría menos glicosilado que en estructuras encefálicas puesto que el antisuero MU/T, generado frente a una secuencia susceptible de sufrir una glicosilación, es más eficaz en bloquear a su antígeno correspondiente.

Por tanto, en el SNC de ratón los agonistas opioides estimulan la actividad GTPásica de alta afinidad de manera concentración-dependiente en un proceso en el que participan los receptores opioides puesto que los antagonistas opioides redujeron dicha activación. La actividad del DAGO, la morfina y la β -end sobre la actividad enzimática está mediada por el receptor

μ , mientras que el efecto del DPDPE y la [D-Ala²]-Deltorfina II está mediado principalmente por el receptor δ . Con respecto al sistema de transducción, en la estimulación de la actividad GTPásica mediada por el receptor μ participan las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{x/\alpha}$ y en la mediada por el receptor δ participa la subunidad $G_{12}\alpha$ pero no la subunidad $G_{x/\alpha}$. La disponibilidad de distintos sistemas de transducción en las diferentes áreas podría justificar la existencia de los subtipos δ_1 y δ_2 . En las células híbridas de neuroblastoma x glioma NG 108-15 tanto los agonistas δ - como los μ -preferentes estimulan, también de modo concentración-dependiente, la actividad GTPásica de baja Km. El efecto estimulatorio de los agonistas para el receptor μ es menor y se previene con la exposición de las células al modificador covalente β -funaltrexamina.

4. Efecto de los péptidos mastoparén y N-acetil- β -endorfina (1-31) sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG de ratón.

El mastoparén, como otros compuestos anfifílicos, es capaz de modificar el funcionamiento de ciertas proteínas G (Higashijima y col., 1988, 1990; Mousli y col., 1990). En concreto, regulan las proteínas transductoras G_i/G_o actuando directamente sobre ellas (Higashijima y col., 1988). Se trata de péptidos cuyas secuencias presentan una cadena hidrofóbica larga y una zona rica en residuos positivos, que podría interaccionar primero con los residuos negativos de la membrana y luego con el extremo carboxilo terminal de la subunidad α de la proteína G (Mousli y col., 1990a). El mastoparén y la NAC cumplirían con este requisito estructural puesto que sus secuencias presentan tres residuos de Lys (posiciones 3, 4, y 11) y cinco residuos de Lys (posiciones 9, 19, 24, 28 y 29), respectivamente.

El derivado N-acetilado de la β -end (NAC) regula la antinocicepción supraespinal mediada por diferentes opioides y por agonistas α_2 -adrenérgicos (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1991; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1992a). Este neuropéptido presenta una baja afinidad por los receptores opioides (Deakin y col., 1980), carece de actividad analgésica cuando se administra i.c.v. en roedores (Smyth y col., 1979), por lo que sus efectos parecen

ejercerse a nivel de las proteínas G (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1993a).

El mastoparén y, quizás también la NAC, tras su unión a la membrana plasmática, la atravesarían, posiblemente por un mecanismo de transferencia electrolítica en el que participan los residuos negativos de la membrana (Higashijima y col., 1988, Mousli y col., 1990b). Se formaría una α hélice muy estructurada en la que los residuos positivos quedarían expuestos al medio acuoso de modo que se mimetizarían los bucles intracelulares de los receptores acoplados a las proteínas G (Higashijima y col., 1988; 1990). Los residuos con cargas positivas y la estructura secundaria helicoidal son esenciales para que se produzcan los efectos estimulatorios del sistema de transducción, puesto que análogos del mastoparén en los que los residuos básicos han sido sustituidos carecen de esta actividad (Danilenko y col., 1993; Song y col., 1993).

El mastoparén, a concentraciones micromolares, estimula la actividad GTPásica de proteínas G_i/G_o purificadas y reconstituídas en vesículas de fosfolípidos (Higashijima y col., 1988; Mousli y col., 1990) y afecta a las actividades enzimáticas fosfolipasa C y ATPasa de Na^+/K^+ presentes en la membrana plasmática de células 3T3 de ratón en cultivo (Danilenko y col., 1993). En este trabajo se recoge que el mastoparén estimula la actividad GTPásica de baja K_m en membranas de PAG de ratón, a concentraciones menores (100 nM). Como el mastoparén no interacciona con ningún receptor, la estimulación que provoca sobre la actividad GTPásica es dependiente de la concentración de péptido que se emplee y no del grado de ocupación del receptor. Se registran, por tanto, incrementos en la estimulación según se incrementa la concentración de mastoparén. Este perfil de respuesta también se ha puesto de manifiesto en experimentos de reconstitución de proteínas G en vesículas fosfolipídicas. Sólo a concentraciones muy altas de mastoparén (mayores de 100 μM) parece producirse una pérdida de afinidad (Higashijima y col., 1990).

Los antagonistas de receptores ligados a proteínas G facilitan el efecto estimulatorio del mastoparén, pero al menos en el caso de la naloxona, sólo

cuando se emplea una concentración subefectiva de mastoparén. Los antagonistas presentaron distinta potencia a la hora de favorecer la liberación de Pi por el mastoparén. La naloxona, antagonista no selectivo de los receptores opioides, el CTOP (análogo de la somatostatina y de secuencia Cys², Tyr³, Orn⁵, Pen⁷ Amida), antagonista selectivo de los receptores opioides μ (Gulya y col., 1986), el nor-BNI (nor-binaltorfimina), antagonista de los receptores opioides κ (Portoghese y col., 1987), potenciaron el efecto del mastoparén a concentraciones menores que las necesarias para observar efecto con el sulpiride, antagonista D₂-dopaminérgico (Terai y col., 1983), el idazoxán, antagonista α_2 -adrenérgico (Doxey y col., 1983), o el ICI 174864, antagonista selectivo de los receptores opioides δ (Cotton y col., 1984). A concentraciones micromolares (100 μ M) el sulpiride y el idazoxán ejercieron un efecto moderado pero significativo sobre la estimulación de la actividad GTPásica provocada por el péptido en estudio. Este comportamiento no se observó al incluir en el ensayo la bicuculina, antagonista de los receptores GABA_A que no están mediados por proteínas G (Curtis y col., 1970; Bowery, 1989). Por tanto, se puede inferir que las proteínas G están implicadas en el efecto facilitador que los antagonistas de receptores acoplados a proteínas G ejercen sobre la activación de la actividad GTPásica provocada por el mastoparén.

El distinto efecto observado para los diferentes antagonistas puede ser consecuencia de, i) distinta densidad de receptores en el área nerviosa estudiada, en este sentido, los receptores μ y κ son más abundantes que el receptor δ en el PAG (Moskowitz y Goodman, 1985; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989; Mansour y col., 1988); ii) diferencias en la afinidad relativa de los antagonistas por sus receptores; iii) diversidad en los sistemas de transducción regulados por esos receptores (Birnbaumer y col., 1990; Yost, 1993). Como se han descrito proteínas G insensibles al mastoparén (los subtipos G_s y G_t) (Higashijima y col., 1988; 1990), el acoplamiento de los receptores a distintos tipos o subtipos de G_i o G_o podría ser el responsable de la distinta eficacia de los antagonistas sobre el efecto estimulador del mastoparén.

Se ha propuesto que el mastoparén incrementa la tasa de intercambio de nucleótidos de guanina y la hidrólisis de GTP al actuar directamente sobre el dominio de la subunidad G_α implicado en la unión con el receptor (Higashijima y col., 1988; 1990). Si ésto fuera cierto, el mastoparén actuaría principalmente sobre proteínas G en su forma heterotrimérica (no ligadas a los receptores), por lo que los antagonistas no podrían influir en su efecto. Los resultados obtenidos en este trabajo, indican que los antagonistas unidos a sus receptores, probablemente porque provocan un cambio en las proteínas G acopladas (Costa et al, 1990; Costa y Herz, 1989), facilitan el acceso del mastoparén a las subunidades G_α (se observa un incremento en la hidrólisis de GTP). De hecho, la disociación del complejo receptor-proteína G provocada por un agonista, elimina el efecto potenciador de los antagonistas sobre la estimulación de la actividad GTPásica observada con el mastoparén. Esta inhibición se observó con el DAGO, la morfina y el DPDPE en presencia del antagonista naloxona. Se propone, por tanto, que el péptido anfifílico mastoparén actúa sobre las proteínas G en un sitio distinto al implicado en la unión al receptor, aunque posiblemente también situado en la zona carboxilo terminal de las subunidades α (Weingarten y col., 1990). En este sentido hay que destacar también los experimentos en los que se ensayaron los efectos de la combinación de los antagonistas μ - y δ -selectivos, CTOP e ICI 174864, y el mastoparén en presencia de los antisueros anti- μ (MU/T) y anti- δ . Con ellos se intentaba determinar de qué modo los receptores opioides (μ y δ) participan en los efectos potenciadores de los antagonistas sobre la estimulación de la actividad GTPásica provocada por el mastoparén. Se observa que una disminución en la ocupación de receptores por el antagonista como consecuencia de la presencia del antisuero supone una reducción de su eficacia potenciadora sobre los efectos del mastoparén en la GTPasa. Por tanto, aunque los antagonistas unidos al receptor no activan directamente las proteínas G, inducen cambios conformacionales en ellas, que facilitan el acceso del mastoparén a las subunidades G_α (Martínez-Peña y col., 1995).

El mastoparén y la NAC presentan ciertas semejanzas en su comportamiento en los ensayos de actividad GTPásica: i) su efecto estimulador aumenta según se incrementa la cantidad de péptido empleado y;

ii) los dos ven modificado su efecto por la presencia de antagonistas. Por todo ello un mecanismo común de actuación para los dos péptidos parece estar implicado. Trabajos recientes de nuestro grupo, realizados "in vivo" en los que la administración de las sustancias se realiza i.c.v., han puesto de manifiesto que el mastoparén se comporta como un antagonista no competitivo de la antinocicepción inducida por los opioides DAGO, morfina, DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II, y por el agonista de los receptores α_2 -adrenérgicos clonidina, administrados en el ratón. La administración previa de NAC evita este comportamiento antagonista del mastoparén (Sánchez-Blázquez y col., 1994; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1995b). El efecto protector de la NAC sólo se manifiesta si el neuropéptido se administra a los animales antes que el mastoparén, por lo que se sugiere un mismo sustrato biológico de actuación para los dos péptidos. En este punto se debe considerar la distinta naturaleza de ambos, el mastoparén, que es un veneno, se comporta como una toxina, mientras que la NAC que es un péptido endógeno actúa como un neuromodulador. Probablemente el sitio de actuación de los dos péptidos son las mismas proteínas G pero el mastoparén parece unirse a ellas con mayor afinidad. El menor tamaño del mastoparén (14 aminoácidos frente a los 31 de la NAC) podría facilitar su acceso a las G_s en la membrana celular, de ahí su mayor efectividad.

Al estudiar el efecto que el mastoparén ejerce sobre la estimulación provocada por distintos agonistas opioides se observa que concentraciones subefectivas del mastoparén reducen dicha estimulación. Los agonistas afectados fueron el DAGO, la morfina, la DADLE y el DPDPE, es decir, los mismos que también ven reducida su capacidad analgésica en presencia de mastoparén en los estudios "in vivo". Hay que señalar que la analgesia mediada por los receptores δ resulta completamente abolida en presencia del veneno peptídico, mientras que la analgesia producida por la activación de los receptores μ presenta un componente que es insensible a la actividad bloqueadora del mastoparén (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1994b). En contraposición con el mastoparén, la NAC a pesar de regular la analgesia mediada por los receptores μ pero no la mediada por los receptores δ (Garzón y Sánchez-Blázquez, 1991; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1992; Sánchez-

Blázquez y Garzón, 1993), no modifica la respuesta GTPásica de las membranas de PAG de ratón frente a sus agonistas.

La NAC sólo mostró su capacidad estimuladora de la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón cuando el ensayo se llevó a cabo en presencia de GTP y a 37°C, es decir, en unas condiciones que favorecen el desacoplamiento de los receptores y las proteínas G. El GTP desplaza al GDP de la subunidad α , lo que provoca que el receptor pase a un estado de baja afinidad. Esto confirmaría la hipótesis de que la NAC tiene acción directa sobre las proteínas G y que su efecto no está mediado por receptores. Sólo cuando las proteínas G se encuentran libres en la membrana son susceptibles de ser modificadas por la NAC. Sin embargo, el mastoparén también resulta efectivo en unas condiciones de experimentación más desfavorables como es una preincubación en frío en ausencia de GTP. Estos resultados ponen de nuevo de manifiesto una mayor facilidad de este péptido para actuar sobre el sistema de transducción.

Los resultados del estudio de las posibles relaciones de competencia y/o facilitación que se establecen entre el mastoparén y la NAC sobre la actividad de las proteínas G muestran que la eficacia del mastoparén como estimulador de la actividad GTPásica se ve incrementada en presencia de concentraciones subefectivas de NAC, que de este modo se vuelve a mostrar como sustancia neuromoduladora. De estos estudios se puede concluir que tanto el veneno peptídico mastoparén como el péptido endógeno NAC estimulan la actividad GTPásica de alta afinidad del PAG del ratón en un proceso no mediado por receptor por lo que se propone un mismo sustrato biológico de actuación, probablemente las mismas proteínas G. Las diferencias observadas en una y otra estimulación podrían ser consecuencia de la diferente naturaleza de los dos péptidos.

CONCLUSIONES

- 1.- Los péptidos endógenos β -endorfina (1-31) y su derivado acetilado "N-acetil- β -endorfina (1-31) se encuentran distribuidos de modo diferencial en el SNC de la rata y el ratón. Los procesos de tolerancia-dependencia a opioides provocan variaciones en el contenido de ambos péptidos. Los cambios observados en los niveles de "N-acetil- β -endorfina (1-31) son de gran interés puesto que aportan una información valiosa acerca de este neuropéptido del que hasta el momento se desconoce su papel funcional aunque se le implica en papeles de reguladores de la función opioide.

- 2.- En el SNC de ratón existen dos actividades enzimáticas responsables de la hidrólisis de GTP, una de las cuales es de alta afinidad y presenta una Km de 0.2-0.3 μ M. La actividad GTPásica de baja Km (o de alta afinidad) presenta una distribución diferencial. El tratamiento crónico con morfina modifica la actividad GTPásica de alta afinidad en el tálamo, el mesencéfalo (incluyendo a la sustancia gris periacueductal) y la médula espinal. Dado que los cambios producidos son de distinto signo (se producen disminuciones en el mesencéfalo y en la médula espinal pero incrementos en el tálamo) los sistemas de neurotransmisión que coexisten con el opioide podrían resultar determinantes en la manifestación celular frente a situaciones de tolerancia-dependencia.

- 3.- La estimulación de la GTPasa de baja Km provocada por agonistas en membranas refleja los acontecimientos que se producen inmediatamente a continuación de la activación del receptor por la unión de un agonista. La potenciación por opioides de la actividad GTPásica de alta afinidad en el SNC de ratón y en las células híbridas de neuroblastoma x glioma NG 108-15 depende directamente de la concentración de agonista utilizada, es ligando-selectiva y reversible por antagonistas opioides. En membranas de PAG de ratón los agonistas opioides DAGO, selectivo del receptor opioide μ ; morfina, agonista preferente del receptor μ ; β -end, agonista opioide μ/δ ; DADLE, agonista opioide δ/μ ; y los agonistas selectivos del receptor δ , DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina

II, estimulan la actividad GTPásica de alta afinidad. El DPDPE tras unirse a los receptores δ del PAG del ratón actúa con menor eficacia que el resto de los agonistas para activar la GTPasa de baja Km. Los antagonistas opioides naloxona (antagonista no selectivo) e ICI 174864 (antagonista selectivo de los receptores δ) redujeron la estimulación de la GTPasa producida por los agonistas opioides, lo que confirma la implicación de los receptores opioides en los efectos estudiados.

- 4.- Los diferencia de efectos del DPDPE y la [D-Ala²]-Deltorfina II sobre la actividad GTPásica de alta afinidad del SNC de ratón están de acuerdo con la existencia de dos subtipos de receptores δ (δ_1 y δ_2), que parecen regular diferentes proteínas transductoras. La disponibilidad de estas proteínas en las distintas áreas del SNC determinará la predominancia de efectos farmacológicos/fisiológicos de uno u otro tipo de receptores opioides δ .
- 5.- Con la utilización de antisueros específicos generados frente a las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{x/x}\alpha$ en experimentos "in vivo" e "in vitro" se ha puesto de manifiesto que en la estimulación de la actividad GTPásica mediada por el receptor δ participa la subunidad $G_{12}\alpha$ pero no la subunidad $G_{x/x}\alpha$, mientras que en la mediada por el receptor μ participan tanto las subunidades $G_{12}\alpha$ y $G_{x/x}\alpha$.
- 6.- En las células híbridas de neuroblastoma x glioma NG 108-15, en las que está descrita la existencia de un único tipo de receptor opioide, el δ , los agonistas preferentes del receptor μ , DAGO y morfina, producen una estimulación concentración-dependiente de la actividad GTPásica aunque de menor magnitud a la ejercida por los agonistas δ selectivos, DPDPE y [D-Ala²]-Deltorfina II. El tratamiento de las células con el modificador covalente del receptor μ , β -funaltrexamina, abole el efecto del DAGO y de la morfina lo que sugiere la existencia de una pequeña población de receptores μ .

- 7.- La actividad del DAGO, la morfina y la β -end sobre la GTPasa de alta afinidad de membranas del SNC de ratón está mediada por el receptor μ puesto que la exposición de las membranas a los antisueros generados frente al receptor μ limita el efecto estimulador de dichos agonistas. La actividad del DPDPE y la [D-Ala²]-Deltorfina II sobre la GTPasa de alta afinidad de membranas del SNC de ratón está mediada principalmente por el receptor δ aunque no se puede descartar la participación del receptor μ .
- 8.- El veneno peptídico mastoparén, a concentraciones nanomolares, estimula la actividad GTPásica de baja Km en membranas de PAG de ratón. Como el mastoparén no interacciona con ningún receptor, la estimulación que provoca sobre la actividad GTPásica no depende del grado de ocupación del receptor sino que aumenta según lo hace la concentración de péptido. Los antagonistas de diferentes receptores ligados a proteínas G (opioides μ , δ y κ , α_2 -adrenérgico y D₂-dopaminérgico) facilitan el efecto estimulador del mastoparén. Las proteínas G parecen estar directamente implicadas en dicho efecto facilitador. Dado que el efecto del mastoparén se sigue manifestando cuando los receptores están ocupados se propone que el péptido anfifílico actúa sobre las proteínas G en un sitio distinto al implicado en la unión al receptor.

El péptido endógeno ³H-N-acetil- β -endorfina (1-31) también estimula la actividad GTPásica de baja Km del PAG de ratón en un proceso no mediado por receptor y únicamente en condiciones experimentales que favorecen el desacoplamiento de los receptores y las proteínas G, es decir, cuando las proteínas G se encuentran libres en la membrana. El mastoparén y la ³H-N-acetil- β -endorfina (1-31) podrían tener un mismo sustrato biológico de actuación, ¿las mismas proteínas G? a pesar de la diferente naturaleza de los dos péptidos: el mastoparén es un veneno que podría comportarse como una toxina y la ³H-N-acetil- β -endorfina (1-31) es un péptido endógeno al que se le asignan papeles funcionales como neuromodulador.

REFERENCIAS

Ableitner A. y Schulz R. (1992). Neuroanatomical sites mediating the central actions of β -endorphin as mapped by changes in glucose utilization: involvement of mu opioid receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 415-423

Aboud M.E., Noel M.A., Farnsworth J.S. y Tao Q. (1994). Molecular cloning and expression of a δ -opioid receptor from rat brain. *J. Neurosci. Res.* 37: 714-719

Adams J.V. y Holtzman S.G. (1990). Tolerance and dependence after continuous morphine infusion from osmotic pumps measured by operant responding in rats. *Psychopharmacology* 100: 451-458

Akil H., Shiomi H. y Matthews J. (1984). Induction of the intermediate pituitary by stress: synthesis and release of a nonopioid form of β -endorphin. *Science* 277: 424-426

Aktories K. y Jakobs K.H. (1981). Epinephrine inhibits adenylate cyclase and stimulates a GTPase in human platelet membranes via α -adrenoceptors. *FEBS Letters* 130: 235-238

Ammer H., Nice L., Lang J. y Schulz R. (1991). Regulation of G proteins by chronic opiate and clonidine treatment in the guinea pig myenteric plexus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 790-796

Ammer H. y Schulz R. (1993). Alterations in the expression of G-proteins and regulation of adenylate cyclase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells chronically exposed to low-efficacy μ -opioids. *Biochem J.* 295: 263-271

Aridor M., Rajmlevich G., Beaven M.A. y Sagi-Eisenberg R. (1993). Activation of exocytosis by the heterotrimeric G protein G_{13} . *Science* 262: 1569-1572

Aroni N. y DiFiglia M. (1992). The subcellular localization of the G-protein $G_{1\alpha}$ in the basal ganglia reveals its potential role in both signal transduction and vesicle trafficking. *J. Neurosci.* 12: 3435-3444

Asano T., Pedersen S.E., Scott C.W. y Ross E.M. (1984). Reconstitution of catecholamine-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to the stimulatory GTP-binding protein of adenylate cyclase. *Biochemistry* 23: 5460-5467

Asano T., Nagahama M. y Kato K. (1990). Subcellular distribution of GTP-binding proteins, G_o and G_{12} , in rat cerebral cortex. *J. Biochem.* 107: 694-698

Baldwin J.M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr. Op. Cell. Biol.* 6: 180-190

Barchfeld C.C. y Medzihradsky F. (1984). Receptor-mediated stimulation of brain GTPase by opiates in normal and dependent rats.

Biochem. Biophys. Res. Commu. 121: 641-648

Basheer R., Yang J. y Tempel A. (1992). Chronic prenatal morphine treatment decreases $G_{\alpha s}$ mRNA levels in neonatal frontal cortex. *Develop. Brain Res.* 70: 145-148

Basheer R. y Tempel A. (1993). Morphine-induced reciprocal alterations in $G_{\alpha s}$ and opioid peptide mRNA levels in discrete brain regions. *J. Neurosci. Res.* 36: 551-557

Baumeister A.A., Richard A.L., Richmond-Landeché L., Hurry M.J. y Waguespack A.M. (1992). Further studies of the role of opioid receptors in the nigra in the morphine withdrawal syndrome. *Neuropharmacology*, 31: 835-841

Berglund L.A., Millington W.R. y Simpkins J.W. (1989). Gonadal steroid and chronic morphine treatment do not change the posttranslational processing of β -endorphin in the rat brain. *Life Sci.* 44: 591-601

Berti-Mattera L.N., Douglas J.G., Mattera R. y Goraya T.Y. (1992). Identification of G protein subtypes in peripheral nerve and cultured Schwann cells. *J. Neurochem.* 59: 1729-1735

Bhargava H.N. y Gulati A. (1990). Down-regulation of brain and spinal cord μ -opiate receptors in morphine tolerant-dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.* 190: 305-311

Birnbaumer L. (1992). Receptor-to-effector signalling through G proteins: roles for $\beta\gamma$ dimers as well as α subunits. *Cell* 71: 1069-1072

Birnbaumer L., Abramowitz J. y Brown A.M. (1990). Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 1031: 163- 224

Bitensky M.W., Wheeler G.L., Yamazaki A., Rasenick M.M. y Stein P.J. (1981). Cyclic-nucleotide metabolism in vertebrate photoreceptors: a remarkable analogy and an unravelling enigma. *Curr. Top. Membr. Transp.* 15: 237-271

Blasig J., Herz A., Reinhold K. y Zieglgänsberger S. (1973). Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats. *Psychopharmacologia* 33: 19-38

Bloom F., Battenberg E., Rossier J., Ling N. y Guillemin R. (1978). Neurons containing β -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1591-1595

Bockaert J. (1991). G proteins and G-protein-coupled receptors: structure, function and interactions. *Curr. Op. Neurobiol.* 1: 32-42

Bodnar R.J., Williams C.L., Lee S.J. y Pasternak G.W. (1988). Role of μ_1 -opiate receptors in supraspinal opiate analgesia: a microinjection study. *Brain Res.* 447: 25-34

Bokoch G.M., Katada T., Northup J.K., Ui M. y Gilman A.G. (1984). Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259: 3560-3567

Bourne H.R., Sanders D.A. y McCormick F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348: 125-132

Bowery N. (1989). GABA_A receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 401-407

Brady L.S., Herkenham M., Long J.B. y Rothman R.B. (1989). Chronic morphine increases μ -opiate receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* 477: 382-386

Bray P., Carter A., Simons C., Guo V., Puckett C., Kamholz J., Spiegel A. y Nirenberg M. (1986). Human cDNA clones for four species of G_α signal transduction protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8893-8897

Bronstein D.M., Przewlocki R. y Akil H. (1990). Effects of morphine treatment on pro-opiomelanocortin systems in rat brain. *Brain Res.* 519: 102-111

Bronstein D.M., Gutsein H.B. y Akil H. (1993). Effects of chronic morphine treatment on β -endorphin-related peptides in the caudal medulla and spinal cord. *J. Neurochem.* 60: 2304-2307

Camps M., Carozzi A., Schnabel P., Scheer A., Parker P.J. y Gierschik P. (1992). Isoenzyme-selective stimulation of phospholipase C- β 2 by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 360: 684-686

Canlon B., Homburger V. y Bockaert J. (1991). The identification and localization of the guanine nucleotide binding protein G_o in the auditory system. *Eur. J. Neurosci.* 3: 1338-1342

Carter B.D. y Medzihradsky F. (1992). Receptor mechanisms of opioid tolerance in SH-SY5Y human neural cells. *Mol. Pharmacol.* 43: 465-473

Carter B.D. y Medzihradsky F. (1993). G_o mediates the coupling of the μ opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4062-4066

Carty D.J., Padrell E., Codina J., Birnbaumer L., Hildebrandt J.D. y Iyengar R. (1990). Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three G_i proteins. *J. Biol. Chem.* 265: 6268-6273

Casey P.J. (1994). Lipid modifications of G proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* 6: 219-225

Casey P.J., Fong H.K.W., Simon M.I. y Gilman A.G. (1990). G_{α} , a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties. *J. Biol. Chem.* 65: 2383-2390

Cassel D. y Selinger Z. (1976). Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 452: 538-551

Chang K.J., Miller R.J. y Cuatrecasas P. (1978). Interaction of enkephalin with opiate receptors in intact cultured cells. *Mol. Pharmacol.* 14: 961-970

Chen L-Y. y Phillips C.A. (1987). Covalent labeling of μ opioid binding site by [^3H] β -funaltrexamina. *Mol. Pharmacol.* 33: 321-329

Chen Y., Mestek A., Liu J., Hurley J.A. y Yu L. (1993). Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44: 8-12

Childers S.R. y Snyder S.H. (1980). Differential regulation by guanine nucleotides of opiate agonist and antagonist receptor interactions. *J. Neurochem.* 34: 583-585

Cho T.M., Hasegawa J., Ge B.L. y Loh H.H. (1986). Purification to apparent homogeneity of a μ -type opioid receptor from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4138-4142

Christie M.J., Chesher G.B. y Bird K.D. (1984). No evidence for a protracted change in endogenous opioid activity following chronic opiate treatment in mice: parallel recovery of cross tolerance to stress and morphine antinociception, *Psychopharmacology*, 82 (1984) 378-381

Clark M.J., Levenson S.D. y Medzihradsky F. (1986). Evidence for coupling of the K opioid receptor to brain GTPase. *Life Sci.* 39: 1721-1727

Clapham D.E. (1994). Direct G protein activation of ion channels?. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 441-464

Clapham D.E. y Neer E.J. (1993). New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365: 403-406

Codina J., Olate J., Abramowitz J., Mattera R., Cook R.G. y Birnbaumer L. (1988). α i-3 cDNA encodes the α subunit of G_{α} , the stimulatory G protein of receptor-regulated K^+ channels. *J. Biol. Chem.* 263: 6746-6750

Collier H.O.J. (1980). Cellular site of opiate dependence. *Nature* 283: 625-629

Connelly C.D., Martinez R.P., Schupsky J.J., Porreca F. y Raffa R.B. (1994). Etonitazene-induced antinociception in μ_1 opioid receptor deficient CXBK mice: evidence for a role for μ_2 receptors in supraspinal antinociception. *Life Sci.* 54: 369-374

Costa T. y Herz A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at δ opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7321-7325

Costa T., Lang J., Gless C. y Herz A. (1990). Spontaneous association between opioid receptors and GTP-binding regulatory proteins in native membranes: specific regulation by antagonists and sodium ions. *Mol. Pharmacol.* 37: 383-394

Cotton R., Miles M.G., Miller L., Shaw J.S. y Timms D. (1984). ICI 174864: a highly selective antagonist for the opioid δ -receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 97: 331-332

Coulter S. y Rodbell M. (1992). Heterotrimeric G proteins in synaptosomal membranes are crosslinked by p-phenylenedimaleimide, yielding structures comparable in size to crosslinked tubulin and F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5842-5846

Curtis D.R., Duggan A.W., Felix D. y Johnston G.A.R. (1970). GABA, bicuculline and central inhibition. *Nature* 226: 1222-1224

Danilenko M, Worland P., Carlson B., Sausville E.A. y Sharoni Y. (1993). Selective effects of mastoparan analogs: separation of G-protein-directed and membrane-perturbing activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1296-1302

Davis M.E., Akera T. y Brody T.M. (1979). Reduction of opiate binding to brainstem slices associated with the development of tolerance to morphine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211: 112-119

Deakin J.F.W., Doströfsky J.O. y Smyth D.G. (1980). Influence of N-terminal acetylation and C-terminal proteolysis on the analgesic activity of β -endorphin. *Biochem. J.* 189:501-506

De Vries T.J., Van Vliet B.J., Hogenboom F., Wardeh G., Van der Laan J.W., Mulder A.H. y Schoffemeer A.N.M. (1991). Effect of chronic prenatal morphine treatment on μ -opioid receptor-regulated adenylate cyclase and neurotransmitter release in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* 208: 97-104

De Vries T.J., Tjon Tien Ril G.H.K., Van der Laan J.W., Mulder A.H. y Schoffemeer A.N.M. (1993). Chronic exposure to morphine and naltrexone induces changes in catecholaminergic neurotransmission in rat brain without altering μ -opioid receptor sensitivity. *Life Sci.* 52: 1685-1693

De Wied D., Kovacs G.L., Bohus B., Van Ree J.M. y Greven H.M. (1978). Neuroleptic activity of the neuropeptide β -LPH 62-77. *Eur. J. Pharmacol.* 49: 427-436

Di Chiara G. y North R.A. (1992). Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 185-193

Dixon R.A.F., Sigal I.S., Rands E., Register R.B., Candelore M.R., Blake A.D. y Strader C.D. (1987). Ligand binding to the β -adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature* 326: 303-334

Dolphin A.C. (1991). Regulation of calcium channel activity by GTP binding proteins and second messengers. *Biochim. Biophys. Acta* 1091: 68-80

Doxey J.C., Roach A.G. y Smith C.F.C. (1983). Studies on RX 781094: A selective, potent and specific of α_2 -adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 78: 489-505

Dunbar B.S. (1987). Two dimensional electrophoresis and immunological techniques. Plenum Press, New York.

Ellerkmann E., Kineman R.D., Porter T.E. y Frawley L.S. (1993). Des-acetylated variants of α -melanocyte-stimulating hormone and β -endorphin can antagonize the mammotrope-recruiting activity of their acetylated forms. *J. Endocrinol.* 139: 295-300

Eppler C.M., Hulmes J.D., Wang J-B., Johnson B., Corbett M., Luthin D.R., Hulmes G.R. y Linden J. (1993). Purification and partial amino acid sequence of a opioid receptor from rat brain. *J. Biol. Chem.* 268: 26447-26451

Eriksson P.S., Carlsson B., Isaksson O.G.P., Hansson E. y Ronnback L. (1992). Altered amount of G-protein mRNA and cAMP accumulation after long-term opioid receptor stimulation of neurons in primary culture from the rat cerebral cortex. *Mol. Brain Res.* 14: 317-325

Evans C.J., Keith Jr. D.E., Morrison H., Magendzo K. y Edwards R.H. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258: 1952-1955

Fedynyshyn J.P. y Lee N.M. (1989). Mu-type opioid receptors in rat periaqueductal gray-enriched P₂ membrane are coupled to guanine nucleotide binding proteins. *Brain Res.* 476: 102-109

Feig L.A. (1994). Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. *Curr. Op. Cell Biol.* 6: 204-211

Fields H.L. y Basbaum A.I. (1978). Brainstem control of spinal pain transmission neurons. *Ann. Rev. Physiol.* 40: 193-221

Fong H.K.V., Amatruda T.T., Birren B.W. y Simon M.I. (1987). Distinct forms of the β subunit of GTP-binding regulatory proteins identified by molecular cloning. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3792-3796

Fong H.K.V., Yoshimoto K.K., Eversole-Cire P. y Simon M.I. (1988). Identification of a GTP-binding protein α subunit that lacks an apparent ADP-ribosylation site for pertussis toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3066-3070

Francis D.L., Roy A.C. y Collier H.O.J. (1986). Morphine abstinence and quasi-abstinence effects after phosphodiesterase inhibitors and naloxone. *Life Sci.* 16: 1901-1906

Franklin P.H. y Hoss W. (1984). Opiates stimulate low K_m GTPase activity. *J. Neurochem.* 43: 1132-1135

Freissmuth M., Schulz W. y Linder M.E. (1991). Interactions of the bovine brain A_1 -adenosine receptor with recombinant G protein α -subunits. *J. Biol. Chem.* 266: 17778-17783

Fukuda K., Kato S., Mori K., Nishi M. y Takeshima H. (1993). Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor δ - and μ -subtypes. *FEBS Lett.* 327: 311-314

García de Yébenes E. y Pelletier G. (1993). Opioid regulation of proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the rat brain as studied by in situ hybridization. *Neuropeptides* 25: 91-94

Garzón J. y Sánchez-Blázquez P. (1987). Biochemical approach to the study of the opioid receptor in the mouse brain. *Rev. Farmacol. Clin. Exp.* 4: 25-34

Garzón J. y Sánchez-Blázquez P. (1988). Adaptative responses in opiate addiction. *Rev. Farmacol. Clin. Exp.* 5: 19-23

Garzón J. y Sánchez-Blázquez P. (1991). 3H -N-acetyl derivatives of β -endorphin (1-31) and (1-27) regulate the supraspinal antinociceptive activity of different opioids in mice. *Life Sci.* 48: 1417-1427

Garzón J. y Sánchez-Blázquez P. (1992). II. 3H -N-acetyl human β -endorphin-(1-31) alleviates the morphine withdrawal syndrome in rodents: a comparative study with clonidine. *Life Sci.* 50: 2099-2109

Garzón J. y Sánchez-Blázquez P. (1995). In vivo injection of antibodies directed against the cloned μ opioid receptor blocked supraspinal analgesia induced by μ -agonists in mice. *Life Sci.* 56: 237-242

Garzón J., Sánchez-Blázquez P., Höllt V., Lee N.M. y Loh H.H. (1983). Endogenous opioid peptides: comparative evaluation of their receptor affinities in the mouse brain. *Life Sci.* 33: 291-294

Garzón J., Schulz R. y Herz A. (1985). Evidence for the ϵ -type of opioid receptor in the rat vas deferens. *Mol. Pharmacol.* 28: 1-9

Garzón J., Juarros J.L. y Sánchez-Blázquez P. (1992). Chronic morphine produces a differential increase of α_{12} -like immunoreactivity in CNS of the mouse and rat. *Int. Narcotics Res. Conf.*, p. 138

Garzón J., Castro M.A., Juarros J.L. y Sánchez-Blázquez P. (1994a). Antibodies raised against the N-terminal sequence of δ opioid receptors blocked δ -mediated antinociception in mice. *Life. Sci.* 54: 191-196

Garzón J., Juarros J.L., Castro M.A. y Sánchez-Blázquez P. (1994b). Immunodetection of μ - and δ -opioid receptor in CNS of the mouse. Changes after chronic morphine treatment. 17th Annual Meeting of the European Neuroscience Association, p. 138

Garzón J., Martínez Peña Y. y Sánchez-Blázquez P. (1994c). Dissimilar efficacy of opioids to produce μ -mediated analgesia: role of G_{i1} and G_{i2} transducer proteins. *Life Sci.* 55: 205-212

Garzón J., Juarros J.L., Castro M.A. y Sánchez-Blázquez P. (1995). Antibodies to the cloned μ opioid receptor detect various molecular weight forms in areas of mouse brain. *Mol. Pharmacol.* 47: 738-744

Gianoulakis C., Drouin J.N., Seidah N.G., Kalant H. y Chretien M. (1981). Effect of chronic morphine treatment on β -endorphin biosynthesis by the rat neurointermediate lobe. *Eur. J. Pharmacol.* 72: 313-321

Gioannini T.L., Yao Y.H., Hiller J.M., Taylor L.P. y Simon E.J. (1993). Antisera against peptides derived from a purified μ -opioid binding protein recognize the protein as well as μ -opioid receptors in brain regions and a cell line. *Mol. Pharmacol.* 44: 796-801

Gilman A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615-649

Glembostski C.C. (1981). Subcellular fractionation studies on the post-translational processing of pro-adrenocorticotrophic hormone/endorphin in rat intermediate pituitary. *J. Biol. Chem.* 256: 7433-7439

Glembostski C.C. (1982). Acetylation of α -melanotropin and β -endorphin in the rat intermediate pituitary. *J. Biol. Chem.* 257: 10493-10500

Goldstein A., Looney L.J. y Pal B.K. (1971). Stereospecific and non specific interaction of the morphine congener levorphanol in subcellular fraction of mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1742-1747

Goodman R.R. y Pasternak G.W. (1985). Visualization of μ_1 opiate receptors in rat brain by using a computerized autoradiographic subtraction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6667-6671

Graziano M. y Gilman A.G. (1989). Synthesis in E. coli of GTPase-deficient mutants of G_{α} . J. Biol. 264: 15475-15482

Green A., Johnson J.L. y Milligan G. (1990). Down-regulation of G_i sub-types by prolonged incubation of adipocytes with an A_1 adenosine receptor agonist. J. Biol.Chem. 265: 5206-5210

Gudehithlu K.P., Tejwani G.A. y Bhargava H.N. (1991). β -endorphin and methionine-enkephalin levels in discrete brain regions, spinal cord, pituitary gland and plasma of morphine tolerant-dependent and abstinent rats. Brain Res. 553: 284-290

Gulya K., Pelton J.T., Hruby V.J. y Yamamura H.I. (1986). Cyclic somatostatin octapeptide analogues with high affinity and selectivity toward mu opioid receptors. Life Sci. 38: 2221-2229

Harlow E. y Lane D. (1988). Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Hepler J.R. y Gilman A.G. (1992). G proteins. Trends Biol. Sci. 17: 383-387

Herz A., Albus K., Metys J., Schubert P. y Teschemacher H. (1970). On the central sites for the antinociceptive action of morphine and phentanyl. Neuropharmacology 9: 539-551

Hescheler J., Rosenthal W., Trautwein W. y Schultz G. (1987). The GTP-binding protein G_o regulates neuronal calcium channels. Nature 325: 445-447

Higashijima T., Uzu S., Nakajima T. y Ross E.M. (1988). Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). J. Biol. Chem. 263: 6491-6494

Higashijima T., Burnier J. y Ross E.M. (1990). Regulation of G_i and G_o by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. J. Biol. Chem. 265: 14176-14186

Hildebrandt J.D., Sekura R.D., Codina J., Iyengar R., Manclark C.R. y Birnbaumer L. (1983). Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. Nature 302: 706-709

Hilf G. y Jakobs K.H. (1989). Activation of cardiac G-proteins by muscarinic acetylcholine receptors: regulation by Mg^{2+} and Na^+ ions. Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect. 172: 155-163

Hinton D.R., Blanks J.C., Fong H.K.W., Casey P.J., Hildebrandt E. y Simons M.I. (1990). Novel localization of a G protein, $G_{i-\alpha}$, in neurons of brain and retina. J. Neurosci. 10: 2763-2770

Hiramatsu Y., Ambudkar I.S. y Baum B.J. (1991). Characterization of high affinity GTPase activity correlated to β -adrenergic receptor stimulation of adenylyl cyclase in rat parotid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1092: 391-396

Höllt V. (1983). Multiple endogenous opioid peptides. *Trends. Neurosci.* 16: 24-26

Höllt V., Przewlocki R. y Herz A. (1978). β -endorphin-like immunoreactivity in plasma, pituitaries and hypothalamus of rats following treatment with opiates. *Life Sci.* 23: 1057-1066

Höllt V., Przewlocki R. y Herz A. (1978). Radiomunoassay of β -endorphin basal and stimulated levels in extracted rat plasma. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 303: 171-174

Höllt V., Gramsch C. y Herz A. (1979). Immunoassay of β -endorphin. In A. Albertini, M. Da Prada and B.A. Peskar (Eds), *Radioimmunoassay of Drugs and Hormones in Cardiovascular Medicine*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 293-307

Höllt V., Przewlocki R., Haarman I., Almeida O.F.X., Kley N., Millan M.J. y Herz A. (1986). Stress-induced alterations in the levels of messenger RNA coding for proopiomelanocortin and prolactin in rat pituitary. *Neuroendocrinology* 43: 277-282

Houben H. y Denef C. (1994). Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides* 15: 547-582

Itoh H., Kozasa T., Nagata S., Nakamura S., Katada T., Ui M., Iwai S., Ohtsuka E., Kawasaki H., Suzuki K. y Kaziro Y. (1986). Molecular cloning and sequence determination of c-DNAs for G_{s1} , G_{i1} , and G_o from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3776-3780

Jacket Y.F. y Lajtha A. (1973). Morphine action at central nervous sites in rat: Analgesia or hyperalgesia depending on site and dose. *Science* 182: 490-492

Jahangeer S. y Rodbell M. (1993). The disaggregation theory of signal transduction revisited: further evidence that G proteins are multimeric and disaggregate to monomers when activated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8782-8786

Jelsema C. y Axelrod J. (1987). Stimulation of phospholipase A_2 activity in bovine rod outer segments by the $\beta\tau$ subunits of transducin and its inhibition by the α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3623-3627

Jiang Q., Mosberg H.I. y Porreca F. (1990). Antinociceptive effects of [D-Ala²]deltorphin II, a highly selective δ agonist in vivo. *Life Sci.* 47: 43-47

Jin W., Lee N.M., Loh H.H. y Thayer S. (1994). Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *J. Neurosci.* 14: 1920-1929

Jones D.T. y Reed R.R. (1987). Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium. *J. Biol. Chem.* 262: 14241-14249

Jones D.T. y Reed R.R. (1988). G_{olr} : an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 144: 790-795

Katada T., Bokoch G.M., Northup J.K., Ui M. y Gilman A.G. (1984). The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259: 3568-3577

Katz A., Wu D. y Simon M.I. (1992). Subunits of beta-gamma of heterotrimeric G proteins activate beta 2 isoforms of phospholipase C. *Nature* 360: 686-689

Khachaturian H., Lewis M.E., Schäfer M.K-H. y Watson S.J. (1985). Anatomy of the CNS opioid systems. *Trend. Neurosci.* 3: 111-119

Kiefel J.M., Rossi G.C. y Bodnar R.J. (1993). Medullary μ and δ opioid receptors modulate mesencephalic morphine analgesia in rats. *Brain Res.* 624: 151-161

Kieffer B.L., Befort K., Gaveriaux-Ruff C. y Hirth C.G. (1992). The δ -opioid receptor: Isolation of a c-DNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12048-12052

Klee W.A. y Streaty R.A. (1974). Narcotic receptor sites in morphine-dependent rats. *Nature* 248: 61-63

Kleuss C., Scherübl H., Hescheler J., Schultz G. y Witting B. (1993). Selectivity in signal transduction determined by τ subunits of heterotrimeric G proteins. *Science* 259: 832-834

Kong H., Raynor K., Yasuda K., Moe S.T., Portoghese P.S., Bell G.I. y Reisine T. (1993). A single residue, aspartic acid 95, in the δ opioid receptor specifies selective high affinity agonist binding. *J. Biol. Chem.* 268: 23055-23058

Koob G.F. y Bloom F.E. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242: 715-723

Koski G. y Klee W.A. (1981). Opiates inhibit adenylate cyclase by stimulating GTP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4185-4189

Koski G., Streaty R.A. y Klee W.A. (1982). Modulation of sodium-sensitive GTPase by partial opiate agonists. *J. Biol. Chem.* 257: 14035-14040

Kurose H., Katada T., Haga T., Ichiyama A. y Ui M. (1986). Functional interaction of purified muscarinic receptors with purified inhibitory guanine nucleotide regulatory proteins reconstituted in phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 261: 6423-6428

Kunkel M.T. y Peralta E.G. (1993). Charged amino acids required for signal transduction by m3 muscarinic acetylcholine receptor. *EMBO Journal* 12: 3809-3815

Lake J.R., Hammond M.V., Shaddox R.C., Hunsicker L.M., Yaug H-Y.T. y Malin D.H. (1991). IgG from neuropeptide FF antiserum reverses morphine tolerance in the rat. *Neurosci. Lett.* 132: 29-32

Lai J., Bilsky E.J., Rothman R.B. y Porreca F. (1994). Treatment with antisense oligodeoxynucleotide to the opioid δ receptor selectively inhibits δ_2 -agonist antinociception. *NeuroReport* 5: 1049-1052

Landis C.A., Masters S.B. y Spada A. (1989). GTPase inhibiting mutations activate the α chain of G_s and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* 340: 692-696

Lang J. y Schulz R. (1989). Chronic opiate receptor activation "in vivo" alters the level of G-protein subunit α -pig myenteric plexus. *Neuroscience*, 32: 503-510

Laugwitz K.-L., Offersmanns S., Spicher K. y Schultz G. (1993). μ y δ opioid receptors differentially couple to G protein subtypes in membranes of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuron* 10: 233-242

Law P.Y., Hom D.S. y Loh H.H. (1983). Opiate receptor down-regulation and desensitization in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells are two separate cellular adaptation processes. *Mol. Pharmacol.* 24: 413-424

Lefkowitz R.J., Kobilka B.K. y Caron M.G. (1989). The new biology of drug receptors. *Biochem. Pharmacol.* 38: 2941-2948

Lefkowitz R.J., Cotecchia S., Samama P. y Costa T. (1993). Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 303-307

Lérida M., Garzón J. y Sánchez-Blázquez P. (1989). Intrathecal pertussis toxin attenuates the morphine withdrawal syndrome in normal but not in arthritic rats. *Life Sci.* 46: 329-334

Levine M.A., Smallwood P.M., Moen P.T., Helman L.J. y Ahn T.G. (1990). Molecular cloning of β_3 subunit, a third form of the G protein β -subunit ptypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2329-2333

Li S., Zhu J., Chen C., Chen Y-W., Deriel J.K., Ashby B. y Liu-Chen L-Y. (1993). Molecular cloning and expression of rat K opioid

receptor. *Biochem. J.* 295: 629-633

Linder M.E., Ewald D.A., Miller R.J. y Gilman A.G. (1990). Purification and characterization of $G_{\alpha s}$ and three types of G_i after expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265: 8243-8251

Lledo P.-M., Johannes L., Vernier P., Zorec R., Darchen F., Vincent J.-D., Henry J.-P. y Mason W.T. (1994). Rab3 proteins: key players in the control of exocytosis. *Trends. Neurosci.* 17: 426-432

Logothetis D.E., Kurachi Y., Galper J., Neer E.J. y Clapham D.E.. (1987). The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. *Nature* 325: 321-326

Lord J.A.H., Waterfield A.A., Hughes J. y Kosterlitz H.W. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-499

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275

Lui-Chen L.-Y., Chongguang C. y Phillips C.A. (1993). β - $[^3H]$ funaltrexamine-labeled μ -opioid receptors: species variations in molecular mass and glycosylation by complex-type, N-linked oligosaccharidases. *Mol. Pharmacol.* 44: 749-756

Lutfy K. y Yoburn B.C. (1991). The role of opioid receptor density in morphine tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256: 575-580

Maggiolo C. y Huidobro J. (1961). Administration of pellets of morphine to mice: abstinence. *Acta Physiol. Latinoamer.* 11: 70-73

Malek D., Münch G. y Palm D. (1993). Two sites in the third inner loop of the dopamine D_2 receptor are involved in functional G protein-mediated coupling to adenylate cyclase. *FEBS Letters* 325: 215-219

Mansour A., Khachaturian H., Lewis M.E., Akil H. y Watson S.J. (1987). Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci.* 7: 2445-2464

Mansour A., Khachaturian H., Lewis M.E., Akil H. y Watson S.J. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.* 11: 308-314

Mansour A., Fox C.A., Akil H. y Watson S.J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends. Neurosci.* 18: 22-29

Marquis K.L., Piesla M.J., Muth E.A., Boast C.A. (1991). Effects of acute/chronic MK-801 on naloxone-precipitated jumping in morphine-dependent mice. *Soc. Neurosci. Abstr.* 17: 97

Martínez J.A., Vargas M.L., Fuentes T., Del Río García J. y Milanés V. (1990). Plasma β -endorphin and cortisol levels in morphine-tolerant rats and in naloxone-induced withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.* 182: 117-123

Martínez-Peña Y. y Garzón J. (1993). Distribution of low Km GTPase activity in mouse CNS: effect of chronic morphine. *Life Sci.* 52: 123-128

Martínez-Peña Y., Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1995). G-receptor antagonists increased the activating effect of mastoparan on low Km GTPase of mouse PAG. *Cell. Signall.* 7: 151-155

Matsouka M., Itoh H., Kozasa T. y Kaziro Y. (1988). Sequence analysis of cDNA for a putative pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5384-5388

Matsouka M., Itoh H. y Kaziro Y. (1990). Characterization of the human gene for $G_{\alpha s}$, a pertussis toxin-insensitive regulatory GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 265: 13215-13220

Mattia A., Farmer S.C., Takemori A.E., Sultana M., Portoghese P.S., Mosberg H.I., Bowen W.D. y Porreca F. (1992). Spinal opioid delta antinociception in the mouse: mediation by a N'-NTII-sensitive delta receptor subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 518-525

McClue S.J., Selzer E., Freissmuth M. y Milligan G. (1992). G_{i3} does not contribute to the inhibition of adenylate cyclase when stimulation of an α_2 -adrenergic receptor causes activation of both G_{i2} and G_{i3} . *Biochem J.* 284: 565-568

McClue S.J., Baron B.M. y Harris B.A. (1994). Activation of G_i protein by peptide structures of the muscarinic M_2 receptor second intracellular loop. *Eur. J. Pharmacol.* 267: 185-193

McKenzie F.R., Kelly E.C.H., Unson C.G., Spiegel A.M. y Milligan G. (1988). Antibodies which recognize the C-terminus of the inhibitory guanine-nucleotide-binding protein (G_i) demonstrate that opioid peptides and foetal-calf serum stimulate the high affinity GTPase activity of two separate pertussis-toxin substrates. *Biochem J.* 249: 653-659

McKenzie F.R. y Milligan G. (1990). δ -opioid-receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase is transduced specifically by the guanine-nucleotide-binding protein G_{i2} . *Biochem. J.* 267: 391-398

Milligan G. (1993a). Regional distribution and quantitative measurement of the phosphoinositidase C-linked guanine nucleotide binding proteins $G_{i1\alpha}$ and $G_{q\alpha}$ in rat brain. *J. Neurochem.* 61: 845-851

Milligan G. (1993b). Agonist regulation of cellular G proteins levels and distribution: mechanisms and functional implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 413-418

Milligan G. (1993c). Mechanisms of multifunctional signalling by G protein-linked receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 239-244

Milligan G. y Green A. (1991). Agonist control of G-protein levels. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 207-209

Millington W.R., O'Donohue T.L., Chappell M.C., Roberts J.L. y Mueller G.P. (1986). Coordinate regulation of peptide acetyltransferase activity and proopiomelanocortin gene expression in the intermediate lobe of the rat pituitary. *Endocrinology* 118: 2024-2033

Min B.H., Augustin L.B., Felsheim R.F., Fuchs J.A. y Loh H.H. (1994). Genomic structure and analysis of promoter sequence of a mouse μ opioid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9081-9085

Mitchell F.M., Mullaney I., Godfrey P.P., Arkinstall S.J., Wakelam M.J.O. y Milligan G. (1991). Widespread distribution of Gq α /G11 α detected immunologically by an antipeptide antiserum directed against the predicted C-terminal decapeptide. *FEBS Lett.* 287: 171-174

Miyamoto Y., Bowen W.D., Portoghese P.S. y Takemori A.E. (1994). Lack of involvement of delta-1 opioid receptors in the development of physical dependence on morphine in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 37-39

Molinoff P.B., Wolfe B. y Weiland G.A. (1981). Quantitative analysis of drug-receptor interactions: II. Determination of the properties of receptor subtypes. *Life Sci.* 29: 427-443

Morello L., Sturani E., Cattaneo M.G., Brambilla R., Vicario A., Alberghina L. y Zippel R. (1991). Bombesin stimulates a high affinity GTPase activity in membranes of Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1092: 397-400

Moriarty T.M., Padrell E., Carty D.J., Omri G., Landau E.M. y Iyengar R. (1990). Go protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway. *Nature* 343: 79-82

Moro O., Lameh J., Högger P. y Sadée W. (1993). Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling. *J. Biol. Chem.* 268: 22273-22276

Moskowitz A.S. y Goodman R.R. (1985). Autoradiographic distribution of Mu₁ and Mu₂ opioid binding in the mouse central nervous system. *Brain Res.* 360: 117-129

Mousli M., Bueb J.L., Bronner C., Rouot B. y Landry Y. (1990a). G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 358-362

Mousli M., Bronner C., Landry Y., Bockaert J. y Rout B. (1990b). Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80. *FEBS Lett.* 259: 260-262

Moxham C.M., Hod Y. y Malbon C.C. (1993). $G_{1\alpha 2}$ mediates the inhibitory regulation of adenylylase in vivo: analysis in transgenic mice with $G_{1\alpha 2}$ suppressed by inducible antisense RNA. *Develop. Gen.* 14: 266-273

Mumby S.M., Casey P.J., Gilman A.G., Gutowski S. y Sternweiss P.C. (1990). G protein τ subunits contain a 20-carbon isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5873-5877

Murray-Whelan R. y Schlegel W. (1992). Brain somatostatin receptor-G protein interaction. *J. Biol. Chem.* 267: 2960-2965

Nakamura S.-I. y Rodbell M. (1990). Octyl glucoside extracts GTP-binding regulatory proteins from rat brain "synaptoneurosome" as large, polydisperse structures devoid of $\beta\gamma$ complexes and sensitive to disgregation by guanine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6413-6417

Neer E.J. y Clapham D.E. (1988). Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 333: 129-134

Nestler E.J. (1992). Molecular mechanisms of drug addiction. *J. Neurosci.* 12: 2439-2450

Nestler E.J., Erdos J.J., Terwilliger R., Duman R.S. y Tallman J.F. (1989). Regulation of G-proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Brain Res.* 476: 230-239

Neubig R.R. (1994). Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J.* 8: 939-946

North R.A. (1986). Opioid receptor types and membrane ion channels. *Trends Neurosci.* 9: 114-116

North R.A., Williams J.T., Surprenant A. y Christie M. (1987). μ and δ receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 5487-5491

Nott N.W. (1968). Potentiation of morphine analgesia by cocaine in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 5: 93-98

Nürnberg B., Spicher K., Harhammer R., Bosserhoff A., Frank R., Hiltz H. y Schultz G. (1994). Purification of a novel G-protein α_o -subtype from mammalian brain. *Biochem J.* 300: 387-394

O'Donohue T.L. (1983). Identification of endorphin acetyltransferase in rat brain and pituitary gland. *J. Biol. Chem.* 258: 2163-2167

Olson G.A., Olson R.D. y Kastin A.J. (1991). Endogenous opiates: 1990. *Peptides* 12: 1407-1432

Olson G.A., Olson R.D. y Kastin A.J. (1992). Endogenous opiates: 1991. *Peptides* 13: 1247-1287

Olson G.A., Olson R.D. y Kastin A.J. (1993). Endogenous opiates: 1992. *Peptides* 14: 1339-1378

Orford M., Mazurkiewicz D., Milligan G. y Saggerson D. (1991). Abundance of the α -subunits of G₁₁, G₁₂ and G_o in synaptosomal membranes from several regions of the rat brain is increased in hypothyroidism. *Biochem. J.* 275: 183-186

Ott S., Costa T. y Herz A. (1989). Opioid receptors of neuroblastoma cells are in two domains of the plasma membrane that differ in content of G proteins. *J. Neurochem.* 52: 619-626

Parolaro D., Patrini G., Giagnoni G., Massi P., Groppetti A. y Parenti M. (1990). Pertussis toxin inhibits morphine analgesis and prevents opiate dependence. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35: 137-141

Parolaro D., Rubino T., Gori E., Massi P., Bendotti C., Patrini G., Marcozzi C. y Parenti M. (1993). In situ hybridization reveals specific increases in *Gas* and *Gao* mRNA in discrete brain regions of morphine-tolerant rats. *Mol. Pharmacol. Sect.* 244: 211-222

Pasternak G.W. y Snyder S.H. (1974). Opiate receptor binding: effects of enzymatic treatments. *Mol. Pharmacol.* 10: 183-193

Pasternak G.W. y Wood P.L. (1986). Multiple mu opiate receptors. *Life Sci.* 38: 1889-1898

Pert C.B. y Snyder S.H. (1973). Opiate receptors: demonstration in neervous tissue. *Science* 179: 1011-1014

Peterson G.L. (1983). Determination of total protein. *Methods in Enzymology*, 91: 95-119

Porreca F., Takemori A.E., Sultana M., Portoghese P.S., Bowen W.D. y Mosberg H.I. (1992). Modulation of mu-mediated antinociception in the mouse involves opioid delta-2 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263: 147-151

Portoghese P.S., Lipkowski A.W. y Takemori A.E. (1987). Binaltorphimine and nor-binaltorphimine, potent and selective K-opioid receptor antagonists. *Life Sci.* 40: 1287-1292

Portoghese P.S., Sultana M., Nagase H. y Takemori A.E. (1992). A highly selective δ_1 -opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone. *Eur. J. Pharmacol.* 218: 195-196

Prather P.L., Loh H.H. y Law P.Y. (1994). Interaction of δ -opioid receptors with multiple G proteins: a non-relationship between agonist potency to inhibit adenylyl cyclase and to activate G proteins. *Mol. Pharmacol.* 45: 997-1003

Przewlocki R., Höllt V., duka T.H., Kleber G., Gramsch C.H., Haarman I. y Herz A. (1978). Long-term morphine treatment decreases endorphin levels in rat brain and pituitary. *Brain Res.* 174: 357-361

Raffa R.B. y Schupsky J.J. (1993). Opioid μ receptor subtypes (possibly μ_1 and μ_2) revealed by morphine-induced antinociception vs endothelin-1 in recombinant inbred CXBK mice. *Life Sci.* 54: 57-62

Raffa R.B., Martinez R.P. y Connelly C.D. (1994). G-protein antisense oligodeoxynucleotides and μ -opioid supraspinal antinociception *Eur. J. Pharmacol.* 258: 5-7

Rall T.W., Sutherland E.W. y Woslait W.D. (1956). The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorilase. *J. Biol. Chem.* 218: 483-495

Rasmussen K., Beitner-Johnson D.B., Krystal J.H., Aghajanian G.K. y Nestler E.J. (1990). Opiate withdrawal and the rat Locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J. Neurosci.* 10: 2308-2317

Rattan A.K., Koo K.L., Tejawani G.A. y Bhargava H.N. (1992). the effect of morphine tolerance dependence and abstinence on immunoreactive dynorphin (1-13) levels in discrete brain regions, spinal cord, pituitary gland and peripheral tissues of the rat. *Brain Res.* 584: 207-212

Raynor K., Kong H., Chen Y., Yasuda K., Yu L., Bell G.I. y Reisine T. (1994). Pharmacological characterization of the cloned K-, δ -, and μ -opioid receptors. *Mol. Pharmacol.* 45: 330-334

T. Reisine y G.I. Bell (1993). Molecular biology of opioid receptors. *Trends Neurosci.* 16: 506-510

Reynolds D.V. (1969). Surgery in the cat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164: 444-445

Rhodes D.L. y Liebeskind J.C. (1979). Analgesia from rostral brainstem stimulation in the rat. *Pain* 7: 51-63

Robdell M., Birmbaumer L., Pohl S.L. y Krans H.M.J. (1971b). The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J. Biol. Chem.* 246: 1877-1992

Robdell M., Krans H.M.J., Pohl S.L. y Birmbaumer L. (1971a). The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver.

IV Binding of glucagon: effect of guanyl nucleotides. *J. Biol. Chem.* 246: 1872-1976

Robishaw J.D., Kalman V.K., Moomaw C.R. y Slaughter C.A. (1989). Existence of two τ subunits of the G proteins in brain. *J. Biol. Chem.* 264: 1578-15761

Roerig S.C. y Fujimoto J.M. (1989). Multiplicative interaction between intrathecally and intracerebroventricularly administered mu opioid agonists but limited interactions between delta and kappa agonists for antinociception in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249: 762-768

Romualdi P., Lesa G. y Ferri S. (1991). Chronic opiate agonists down-regulate prodynorphin gene expression in rat brain. *Brain Res.* 563: 132-136

Ross E.M. y Gilman A.G. (1977). Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 252: 6966-6969

Rossier J., Vargo T.M., Minick S., Ling N., Bloom F.E. y Guillemin R. (1977). Regional distribution of β -endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5162-5165

Rossier J. y Bloom F. (1979). "Central neuropharmacology of endorphins", en *Neurochemical mechanism of opiate and endorphins*.

Rothman R.B., Long J.B., Bykov V., Jacobson A.E., Rice K.C. y Holaday J.W. (1988). Beta-FNA binds irreversibly to the opiate receptor complex: in vivo and in vitro evidence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 405-416

Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1988). Pertussis toxin differentially reduces the efficacy of opioids to produce supraspinal analgesia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 152: 357-361

Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1989). Evaluation of δ receptor mediation of supraspinal opioid analgesia by in vivo protection against the β -funaltrexamine antagonist effect. *Eur. J. Pharmacol.* 159: 9-23

Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1992a). Further characterization of "N-acetyl β -endorphin (1-31) regulatory activity, I: Effect on opioid- and α_2 -mediated supraspinal antinociception in mice. *Life Sci.* 50: 2083-2097

Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1992b). Intracerebroventricular injection of antibodies directed against G_{12} enhances the supraspinal antinociception induced by morphine, β -endorphin and clonidine in mice. *Life Sci.* 51: 237-242

Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1993a). N-Acetyl β -endorphin-(1-31) and substance P regulate the supraspinal antinociception mediated by mu opioid and α_2 adrenoceptors but not by delta opioid receptors in the

mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 835-843

Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1993b). δ -opioid supraspinal antinociception in mice is mediated by G_{i1} transducer proteins. *Life Sci.* 53: 129-134

Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1994a). Antibodies directed against α subunits of G_{i1} , G_{i2} , G_o and G_s transducer proteins reduced the morphine withdrawal syndrome in mice. *Life Sci.* 55: 445-450

Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1994b). Mastoparan reduces the supraspinal analgesia mediated by μ/δ -opioid receptors in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 258: 159-162

Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1995a). δ -opioid receptor subtypes regulate distinct $G\alpha$ subunits to mediate supraspinal analgesia. XXIV International Narcotic Research Conference

Sánchez-Blázquez P. y Garzón J. (1995b). 3H -N-acetyl β -endorphin-(1-31) disrupts the diminishing effect of mastoparan on opioid- and clonidine-evoked supraspinal antinociception in mice. *J. Exp. Ther.* 273: 787-792

Sánchez-Blázquez P., Juarros J.L., Martínez-Peña Y., Castro M.A. y Garzón J. (1993). G_{i1} and G_{i2} transducer proteins on μ/δ opioid-mediated supraspinal antinociception. *Life Sci.* 53: 381-386

Sánchez-Blázquez P., Martínez-Peña P. y Garzón J. (1994). 3H -N-acetyl β -endorphin (1-31) prevents mastoparan-induced impairment of opioid-mediated supraspinal antinociception in mice. 17th Annual Meeting of the European Neuroscience Association, p. 133

Selley D.E. y Bidlack J.M. (1992). Effects of β -endorphin on mu and delta opioid receptor-coupled G-protein activity: Low-Km GTPase studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263: 99-104

Sharif N.A. y Hughes J. (1989). Discrete mapping of brain mu and delta opioid receptors using selective peptides: quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors. *Peptides* 10: 499-522

Sharma S.K., Nirenberg M. y Klee W.A. (1975). Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 590-594

Simantov R., Snowman A.M. y Snyder S.H. (1976). Temperature and ionic influences on opiate receptor binding. *Mol. Pharmacol.* 12: 977-986

Simon E.J., Hiller J.M. y Edelman I. (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic 3H -etorphine to rat brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1947-1949

Simon M.I., Strathmann M.P. y Gautam N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252: 802-809

Siuciak J.A. y C. Advokat C. (1987). Tolerance to morphine microinjections in the periaqueductal gray (PAG) induces tolerance to systemic, but not to intrathecal morphine. *Brain Res.* 424: 311-319

Smrcka A.V., Hepler J.R., Brown K.O. y Sternweiss P.C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G_q . *Science* 251: 804-807

Smyth D.G., Massey D.E., Zakarian S. y Finnie M.D.A. (1979). Endorphins are stored in biologically active and inactive forms: isolation of α -N-acetyl peptides. *Nature* 279: 252-254

Smyth D.G. y Zakarian S. (1980). Selective processing of β -endorphin in regions of porcine pituitary. *Nature* 288: 613-615

Sofuoglu M., Portoghese P.S. y Takemori A.E. (1991). Differential antagonism of delta opioid agonists by naltridole (NTI) and its benzofuran analog (NTB) in mice: Evidence for delta opioid receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 676-680

Song D-L., Chanh G-D., Ho C-L y Chang C-H. (1993). Structural requirements of mastoparan for activation of membrane-bound guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* 247: 283-288

Sternweiss P.C. (1994). The active role of $\beta\tau$ in signal transduction. *Curr. Op. Cell Biol.* 6: 194-203

Sternweiss P.C., Northup J.K., Smigel M.D. y Gilman A.G. (1981). The regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 256: 11517-11526

Sternweiss P.C. y Robishaw J.D. (1984). Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J. Biol. Chem.* 259: 13806-13813

Sternweiss P.C. y Smrcka A.V. (1992). Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends. Biol. Sci.* 17: 502-506

Strathmann M., Wilkie T.M. y Simon M.I. (1989). Diversity of the G-protein family: sequences from five additional α subunits in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7407-7409

Strathmann M., Wilkie T.M. y Simon M.I. (1990). Alternative splicing produces transcripts encoding two forms of the α subunit of GTP-binding protein G_o . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6477-6481

Strosberg A.D. (1991). Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. *Eur.*

J. Biochem. 196: 1-10

Stryer L., Hurley J.B. y Fung B.K.-K. (1981). First stage of amplification in the cyclic-nucleotide cascade of vision. *Curr. Top. Membr. Transp.* 15: 93-108

Sullivan K.A., Miller R.T., Masters S.B., Beiderman B., Heideman W. y Bourne H.R. (1987). Identification of receptor contact site involved in receptor-G protein coupling. *Nature* 330: 758-762

Suki W.N., Abramowitz J., Mattera R., Codina J. y Birnbaumer L. (1987). The human genome encodes at least three non-allelic G proteins with α_1 -type subunits. *FEBS Lett.* 220: 187-192

Suzuki T., Hayashi Y. y Misawa M. (1992). The role of μ_1 in physical dependence on morphine using the μ receptor deficient CXBK mice. *Life Sci.* 50: 849-856

Sweep C.G.J., Wiegant V.M., De Vry J. y Van Ree J. (1989). β -end in brain limbic structures as neurochemical correlate of psychic dependence on drugs. *Life Sci.* 44: 1133-1140

Sweeney M.I. y Dolphin A.C. (1992). 1,4-dihydropyridines modulate GTP hydrolysis by G_o in neuronal membranes. *FEBS Lett.* 310: 66-70

Takahashi M., Seuda T. y Kaueto H. (1991). Role of spinal K opioid receptors in the blockade of the development of antinociceptive tolerance to morphine. *Eur. J. Pharmacol.* 200: 293-297

Takemori A.E. y Portoghese P.S. (1993). Enkephalin antinociception in mice is mediated by δ_1 - and δ_2 -opioid receptors in the brain and spinal cord, respectively. *Eur. J. Pharmacol.* 242: 145-150

Tallarida R.J. y Murray R.B. (1981). *Manual of Pharmacologic Calculations with computer programs.* Springer-Verlag, New York.

Tamir H., Fawzi A.B., Tamair A., Evans T. y Northup J.K. (1991). G proteins beta gamma forms: identity of beta and diversity of gamma subunits. *Biochemistry* 30: 3929-3936

Tang W.-J., Ifigúez-LLuhi J.A., Mumby S. y Gilman A.G. (1992). Regulation of mammalian adenylyl cyclases by G-protein α and $\beta\gamma$ subunits. *En: Cold Spring Harbou Symposia on Quantitative Biology*, vol. LVII: 135-144

Tao P.-L., Lee C.-R., Law P.-Y. y Loh H.H. (1993). The interaction of the μ -opioid receptor and G protein is altered after chronic morphine treatments in rats. *Naunyn-Schmiedelberg's Arch. Pharmacol.* 348: 504-508

Taylor C.W. (1990). The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochem J.* 272: 1-13

Taylor S.J., Chae H.Z., Rhee S.G. y Exton J.H. (1991). Activation of the $\beta 1$ isozyme of phospholipase C by α subunits of the G_q class of G proteins. *Nature* 350: 516-518

Tempel A. y Zukin S. (1987). Neuroanatomical patterns of the μ , δ and K opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4308-4312

Terenius L. (1973). Characteristic of the "receptor" for narcotic analgesia in synaptic plasma membrane fractions from rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 33: 377-384

Terai M., Usuda S., Kuroiwa I., Noshiro O. y Maeno H. (1983). Selective binding of YM-09151-2, a new potent neuroleptic, to D_2 -dopaminergic receptors. *Jpn. J. Pharmacol.* 33: 749-755

Thompson R.C., Mansour A., Akil H. y Watson S.J. (1993). Cloning and pharmacological characterization of a rat μ opioid receptor. *Neuron* 11: 903-913

Tseng L.F., Collins K.A. y Kampine J.P. (1994). Antisense oligodeoxynucleotide to a δ -opioid receptor selectively blocks the spinal antinociception induced by δ -, but not μ - or K-opioid receptor agonists in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 258: 1-3

Ueda H., Misawa H., Fukushima N. y Takagi H. (1987). The specific opioid K-agonist U-50,488H inhibits low K_m GTPase. *Eur. J. Pharmacol.* 138: 129-132

Ueda H., Harada H., Nozari H., Katada T., Ui H., Satoh M. y Takagi H. (1988). Reconstitution of the rat brain μ opioid receptors with purified guanine nucleotide-binding regulatory proteins, G_i and G_o . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7013-7017

Uhl G.R., Childers S. y Pasternak G. (1994). An opiate-receptor gene family reunion. *Trends. Neurosci.* 17: 89-93

Vachon L., Costa T. y Herz A. (1987). GTPase and adenylate cyclase desensitize at different rates in NG108-15 cells. *Mol. Pharmacol.* 31: 159-168

VanDongen A.M.J., Codina J., Olate J., Mattera R., Joho R., Birnbaumer L. y Brown A.M. (1988). Newly identified brain potassium channels gated by the guanine nucleotide binding protein G_o . *Science* 242: 1433-1437

Van Vliet B.J., Wardeh G., Mulder A.H. y Schoffelmeer A.N.M. (1991). Reciprocal effects of chronic morphine administration on stimulatory and inhibitory G-protein α subunits in primary cultures of rat striatal neurons. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sec.* 208: 341-342

Vogel Z., Barg J., Attali B. y Simantov R. (1990). Differential effect of μ , δ and K ligands on G protein α subunits in cultured brain cells. *J. Neurosci. Res.* 27: 106-111

Von Weizsacker E., Strathman M.P. y Simon M.I. (1992). Diversity among the beta subunits of heterotrimeric GTP-binding proteins: characterization of a novel beta-subunit cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 183: 350-356

Ward S.J., Portoghese P.S. y Takemori A.E. (1982). Pharmacological characterization in vivo of the novel opiate, β -funaltrexamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220: 494-498

Wang J.B., Imai Y., Eppler C.M., Gregor P., Spivak C.E. y Uhl G.R. (1993). μ opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10230-10234

Watson S.J., Barchas J.D. y Hao Li C. (1977). β -lipotropin: localization of cells and axons in rat brain by immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5155-5158

Weber E., Evans C.J., Chang J-K. y Barchas J.D. (1982). Antibodies specific for α -N-acetyl- β -endorphins: Radioimmunoassays and detection of acetylated β -endorphins in pituitary extracts. *J. Neurochem.* 38: 436-447

Weingarten R., Ransnäs L., Mueller H., Sklar L.A. y Bokoch G.M. (1990). Mastoparan interacts with the carboxyl terminus of the α subunit of G_i . *J. Biol. Chem.* 265: 11044-11049

Werling L.L., McMahon P.N. y Cox B.M. (1989). Selective changes in μ opioid receptor properties induced by chronic morphine exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6393-6397

Werz M.A. y McDonald R.L. (1985). Dynorphin and neoendorphin peptides decrease dorsal root ganglion neuron calcium-dependent action potential duration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234: 49-51

Wiegant V.M., Verhoef J., Burbach J.P.H. y Van Amerongen A. (1983). Characterization of N⁶-acetyl- α -endorphin from rat neurointermediate lobe and its distribution in pituitary and brain. *Life Sci.* 33: 125-128

Wolozin B.L. y Pasternak G.W. (1981). Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6181-6185

Wong C.-S., Su Y.-F., Watkins W.D. y Chang K.-J. (1992). Continuous intrathecal opioid treatment abolishes the regulatory effects of magnesium and guanine nucleotides on mu opioid receptor binding in rat spinal membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 317-326

Wong Y.H., Conklin B.R. y Bourne H.R. (1992). G_s-mediated hormonal inhibition of cyclic AMP accumulation. *Science* 255: 339-342

Xu H., Partilla J.S., De Costa B.R., Rice K.C. y Rothmann R.B. (1993). Differential binding of opioid peptides and other drugs to two subtypes of opioid δ_{ex} binding sites in mouse brain: further evidence for δ receptor heterogeneity. *Peptides* 14: 893-907

Yamamoto H., Tomita U., Mikuni M., Kobayashi I., Kagaya A., Katada T., Ui M. y Takahashi K. (1992). Direct activation of purified G_o-type GTP binding protein by tricyclic antidepressants. *Neurosci. Lett.* 139: 194-196

Yamane H.K., Farnsworth C.C., Xie H., Howald W., Fung B.K.-K., Clarke S., Gelb M.H. y Glomset J.A. (1990). Brain G protein τ subunits contain an all-trans-geranyl-cysteine methyl ester at their carboxyl termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5868-5872

Yamane H.K. y Fung B.K.-K. (1993). Covalent modifications of G-proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 201-241

Yasuda K., Raynor K., Kong H., Breder C.D., Takeda J., Reisine T. y Bell G.I. (1993). Cloning and functional comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6736-6740

Yatani A., Imoto Y., Codina J., Hamilton S.L., Brown A.M. y Birnbaumer L. (1988a). The stimulatory G protein of adenylyl cyclase, G_s, directly stimulates dihydropyridine-sensitive skeletal muscle Ca²⁺ channels. Evidence for direct regulation independent of phosphorylation by camp-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 263: 9887-9895

Yatani A., Mattera R., Codina J., Graf R., Okabe K., Padrell E., Iyengar R., Brown A.M. y Birnbaumer L. (1988b). The G protein-gated atrial K⁺ channel is stimulated by three distinct G α -subunits. *Nature* 336: 680-682

Yoburn B.C., Chen J., Huang T. y Inturrisi C.E. (1985). Pharmacokinetics a pharmacodynamics of subcutaneous morphine pellets in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235: 282-286

Yoburn B.C., Luke M.C., Pasternak G.W. y Inturrisi C.E. (1988). Upregulation of opioid receptor subtypes correlates with potency changes of morphine and DADLE. *Life Sci.* 43: 1319-1324

Yoburn B.C., Sierra V. y Lufty K. (1989a). Chronic opioid antagonist treatment: assessment of receptor upregulation. *Eur. J. Pharmacol.* 170: 193-200

Yoburn B.C., Kreuscher S.P., Inturrisi C.E. y Sierra V. (1989b). Opioid receptor upregulation and supersensitivity in mice: effect of morphine sensitivity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32: 727-731

Yoburn B.C., Lufty K. y Candido J. (1991). Species differences in μ - and δ -opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 193: 105-108

Yoburn B.C., Billings B. y Duttaroy A. (1993). Opioid receptor regulation in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 314-320

Yost C.S. (1993). G proteins: basic characteristics and clinical potential for the practice of anesthesia. *Anesth. Analg.* 77: 822-834

Young L.T., Li P.P., Siu K.P., Kish S.J. y Warsch J.J. (1993). Regional distribution of guanine nucleotide binding proteins (G_s and $G_{i\alpha}$) in human brain: correlation with adenylyl cyclase activity. *Neurochem. Int.* 22: 285-291

Zakarian S. y Smyth D. (1979). Distribution of active and inactive forms of endorphins in rat pituitary and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5972-5976

Zakarian S. y Smyth D. (1982). β -endorphin is processed differently in specific regions of rat pituitary and brain. *Nature* 296: 250-252

Zhu S.Z., Wang S.Z., Hu J. y El-Fakahany E. (1994). An arginine residue conserved in most G protein-coupled receptors is essential for the function of the m1 muscarinic receptor. *Mol. Pharmacol.* 45: 517-523